VISIT…

LANZAROTE
Caliente.COM

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ ЦИТОЛОГИИ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОПТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. С. И. ВАВИЛОВА

Л. А. ФЕДИН,
И. Я. БАРСКИЙ



МИКРОФОТОГРАФИЯ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
Ленинградское отделение
ЛЕНИНГРАД · 1971

УДК 535.82 + 578.086.9 + 778.31

Микрофотография. Федин Л. А., Барский И. Я. 1971. Изд-во «Наука», Ленингр. отд., Л. 1—220.

В книге излагаются основы теории микроскопа и фотографического процесса, описываются современные модели микроскопов и устройств для фотографирования. Даются рекомендации по выбору аппаратуры, фотоматериалов и светофильтров для съемки через микроскоп, а также практические рекомендации по микрофотографированию различных объектов (биологических, металлографических, минералогических и др.). Приведена обширная библиография. Книга рассчитана на широкий круг экспериментаторов, работающих в области биологии, металлографии, минералогии, кристаллографии и имеющих дело с микрофотографированием. Она может быть также полезной для сотрудников технических научных и учебных учреждений, практика работы которых связана с микроскопом. Илл. 176, табл. 22, библ. 385 назв.

Ответственный редактор

Н. И. ПОЛЯКОВ

Леонид Андреевич Федин, Исаак Яковлевич Барский

МИКРОФОТОГРАФИЯ

Утверждено к печати
Научным советом по проблемам цитологии
Академии наук СССР

Редактор издательства *А. В. Козлов.* Художник *М. О. Разулевич*
Технический редактор *Р. А. Кондратьева.* Корректор *В. А. Пузиков*

Сдано в набор 4/XI 1970 г. Подписано к печати 1/IX 1971 г. Формат бумаги $70 \times 108^1/_{16}$. Печ. л. $15^1/_4 + 1$ вкл. = 21.52 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 20.16. Изд. № 4314. Тип. зак. № 1190. М-08258. Тираж 10000. Бум. № 2. *Цена 1 р. 86 к.*

Ленинградское отделение издательства «Наука». 199164, Ленинград, Менделеевская лин., д. 1

1-я тип. издательства «Наука». 199034, Ленинград, 9 линия, д. 12

2-10-2; 3-21-3
456-71 (I)

ВВЕДЕНИЕ

С тех пор как около 300 лет назад был изобретен микроскоп, тысячи исследователей многих поколений проводили за ним долгие часы, изучая невидимый глазом мир органической и неорганической природы. Развитие науки и техники привело к появлению в микроскопии новых методов исследования и совершенной аппаратуры. Пришла в микроскопию и фотография. В настоящее время фотографирование препаратов, изображение которых увеличено микроскопом,— очень важный, а порой и незаменимый способ в практике изучения микроскопических объектов. Микрофотографирование — это не только средство для иллюстрирования проводимой работы. Это — средство для документирования и сохранения во времени изображений микрообъектов; это — научный метод исследования и анализа изображений; это — способ превращения невидимых ультрафиолетовых и инфракрасных изображений в видимые. Отсюда ясно, почему микрофотографирование применяют везде, где для каких-либо исследований используют микроскоп. В биологических и медицинских, минералогических и металлографических, физических и химических, технических и других лабораториях микроскописты часто прибегают к фотографированию. Предлагаемая книга призвана помочь им в их работе.

Материал книги расположен так, что практика микрофотографии излагается начиная с пятой главы. Сюда относятся как общие, так и специфические вопросы, связанные с определенными областями исследований. Тот, кто захочет познакомиться с основами теории микроскопа и фотографического процесса, может обратиться ко второй и четвертой главам. В первой главе даны краткие сведения и понятия о явлениях и законах, лежащих в основе теории микроскопа, методов микроскопирования и микрофотографирования. Это может избавить читателя от необходимости обращаться к специальной литературе для того, чтобы глубже понять изложенный в книге материал по микрофотографии. Разумеется, для более полного ознакомления с теоретическими вопросами следует воспользоваться специальной литературой. В третьей главе кратко сообщается о наиболее интересных типах приборов, выпускаемых Ленинградским оптико-механическим объединением (ЛОМО) и некоторыми иностранными фирмами. Приведенные приборы не исчерпывают всей обширной номенклатуры. Они дают лишь некоторое представление о том многообразии аппаратуры, которая предназначается для микрофотографирования.

Умелый выбор прибора, знание его теории и понимание явлений, имеющих место в микроскопии, должны способствовать получению высококачественных фотографий. Однако не следует забывать, что нельзя добиться хорошего снимка с плохого объекта. Немаловажное значение для получения хорошей фотографии имеет, конечно, опыт, и изложенный здесь материал должен помочь его приобрести.

Приведенный в книге список литературы охватывает практически всю библиографию по микрофотографии за последние 20 лет, а также

основную библиографию по теоретическим и методическим вопросам микроскопии и фотографического процесса.

Книга иллюстрирована большим количеством микрофотографий, приложенных в конце книги. Номера этих иллюстраций отмечены в тексте звездочками.

Вопросы микрокиносъемки, фотографирования в электронной микроскопии и в контрольно-измерительной технике не затрагивались, так как они относятся к обособленным разделам.

Авторы считают своим долгом выразить глубокую благодарность Т. Н. Хавкину, Л. Н. Цветковой, М. С. Шудель и В. А. Якубенасу за помощь в оформлении рукописи.

Авторы будут признательны читателям за любые замечания о книге, которые они надеются использовать в дальнейшей работе. Отзывы можно направлять по адресу: 196121, Ленинград, пр. Маклина, д. 32. Институт цитологии АН СССР.

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ

A — апертура.
a — амплитуда колебания.
B — яркость.
c — скорость света (излучения).
D — оптическая плотность; линейное поле зрения окуляра.
d — толщина среды; линейное поле зрения микроскопа.
E — освещенность.
F — фокус.
f — фокусное расстояние.
G — фактор зернистости.
I — сила света.
i — угол между лучом и нормалью к поверхности.
J — интенсивность света.
H — количество освещения; главная плоскость.
h — постоянная Планка.
K — длина камеры.
k — постоянная Больцмана.
L — фотографическая широта.
l — размер предмета.
m — порядок интерференции.
N — число преломляющих поверхностей.
n — показатель преломления.
p — расстояние наилучшего видения.
Q — продольное увеличение.
R — разрешающая способность фотографического материала.
$R_э$ — энергетическая светность.
r — спектральная плотность энергетической светности; кривизна преломляющей поверхности; радиус выходного зрачка микроскопа.
S — светочувствительность.
s — площадь источника излучения.
T — период колебания; температура в °K; глубина резкого изображения.
$\bar{T}$ — глубина дифракционного изображения точки.
t — время.
U — напряжение электрической сети.
u — половина линейного угла при вершине конуса лучей.
u_m — апертурный угол.
V — линейное увеличение; увеличение объектива.
W — энергия.
w — угловой размер предмета.
X — перемещение окуляра на 1 диоптрию.
x — расстояние от фокуса до предмета.
y — функция колебания.
z — диафрагменное число.
α — коэффициент поглощения.
β — масштаб изображения.
Γ — увеличение микроскопа.
$\Gamma_{ок}$ — увеличение окуляра.
γ — коэффициент контрастности.
Δ — разность хода; оптический интервал; оптическая длина тубуса.
δ — разность фаз двух волн; разрешающая способность микроскопа.
$\delta_р$ — диаметр кружка рассеяния.
ε — энергия кванта; острота зрения.
η — мера плеохроизма.
λ — длина световой волны.
ν — частота колебаний.
ρ — коэффициент отражения.
$\rho_э$ — радиус диска Эри.
σ — площадь приемника излучения.
τ — коэффициент пропускания.
Φ — поток излучения; оптическая сила линзы.
φ — спектральная плотность потока излучения.
ω — телесный угол.
дптр — диоптрия (1 дптр $= 1/1$ м).
мкм — микрометр (старое название микрон; 1 мкм $= 10^{-3}$ мм).
нм — нанометр (1 нм $= 10^{-6}$ мм).

Глава I

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

Если некоторая материальная среда при переходе из состояния с большей энергией в состояние с меньшей энергией испускает электромагнитные волны, то энергия, переносимая этими волнами, называется энергией излучения и измеряется в джоулях. Сказав «волна», надо здесь же сделать оговорку. Существуют два представления о природе излучения: волновое и корпускулярное. В микроскопии большинство явлений трактуется с точки зрения волновой природы. Поэтому в основном о волнах и их поведении в различных условиях будет идти речь.

Итак, излучение вызывается определенными процессами, происходящими внутри молекул, атомов, ионов, электронов или между ними. Электромагнитное излучение распространяется в вакууме со скоростью $c \approx 3 \cdot 10^8$ м/сек.

Распространение электромагнитной волны принято описывать в виде синусоиды (рис. 1), имеющей амплитуду a. Расстояние между двумя точками, находящимися в одной *фазе* колебания, называют *длиной волны* λ, а время, за которое волна проходит это расстояние,— *периодом* колебания T. Эти величины связаны со скоростью распространения излучения соотношением

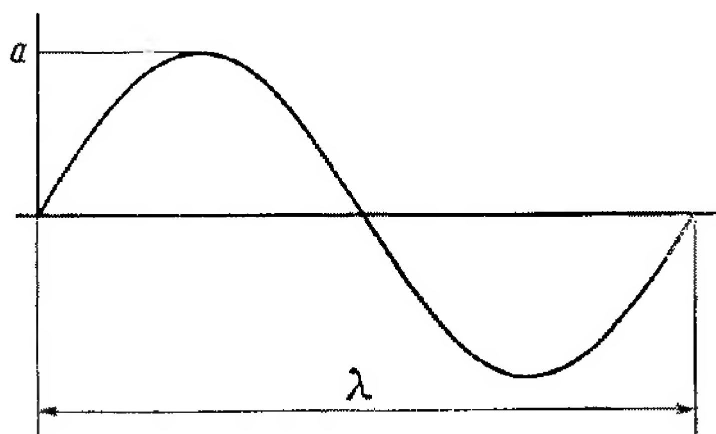


Рис. 1. Графическое представление волны излучения.

$$\lambda = cT = c/\nu, \qquad (1)$$

где ν — частота колебания.

Излучение одной длины волны называют *монохроматическим*. Несколько длин волн (частот) или диапазон длин волн составляют *спектр*.

Математически уравнение волны имеет вид

$$y = a \sin \nu t, \qquad (2)$$

где t — текущее время.

Длина волны (или диапазон длин волн) излучения зависит от физических свойств источника и условий его возбуждения. Спектральный интервал оптического излучения, с которым в настоящее время имеют дело в световой микроскопии, лежит в пределах длин волн от 0.25 до 1.2 мкм, причем в области длин волн от 250 до 380 нм находятся ультрафиолетовые, от 380 до 770 нм — видимые, от 0.77 до 1.2 мкм — инфракрасные излучения. Излучение большинства источников имеет сложную

спектральную структуру: спектр атомов — линейчатый, молекулы дают излучение в тех или иных диапазонах длин волн, у тепловых источников спектр сплошной или непрерывный. Сплошной спектр излучения в видимом диапазоне воспринимается глазом как белый *свет*. Отдельные участки этого диапазона вызывают в зрительном аппарате ощущение *цвета*. На рис. 2 графически представлены описываемые спектральные диапазоны с указанием границ цветовых интервалов и основных спектральных линий некоторых химических элементов.

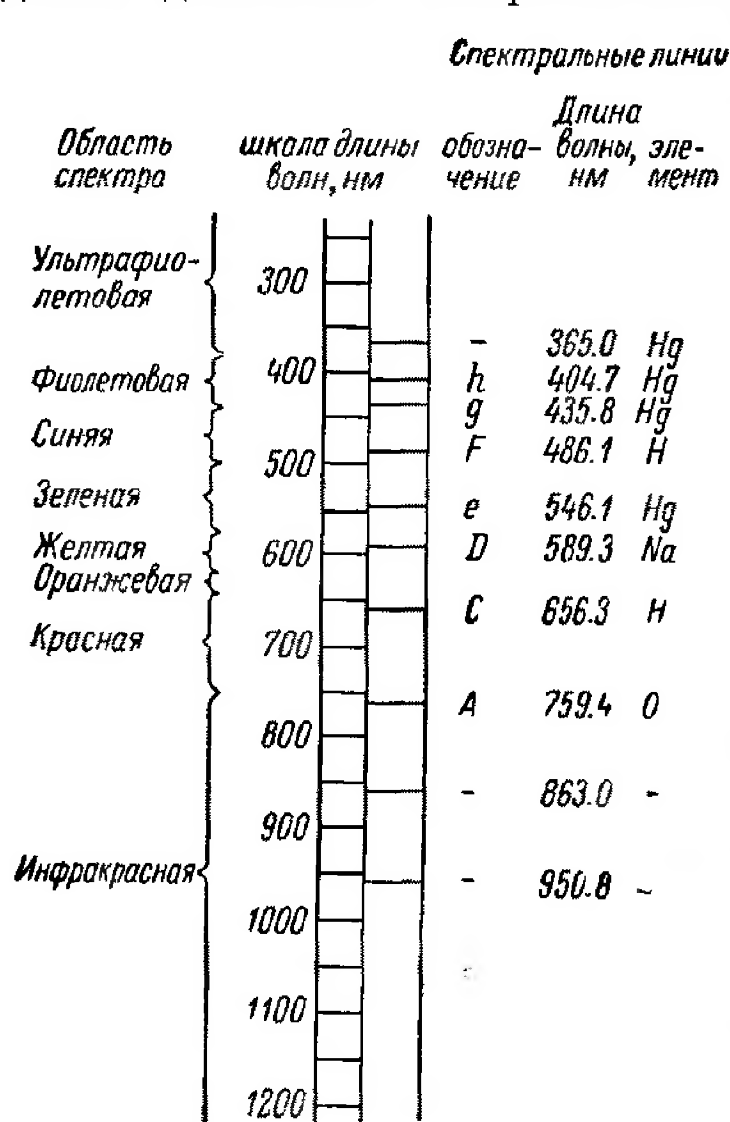


Рис. 2. Спектральный диапазон излучения, применяемый в микроскопии.

Согласно корпускулярной теории, излучение — это поток квантов. Энергия кванта равна

$$\varepsilon = h\nu, \tag{3}$$

где $h = 6.62491 \cdot 10^{-34}$ вт·сек.^{2} — постоянная Планка. По волновой теории интенсивность излучения равна квадрату амплитуды a^2.

Излучение характеризуют следующими величинами.

1. Энергетический поток излучения — средняя мощность излучения за время, значительно большее периода колебаний:

$$\Phi_э = \frac{W}{t} \text{ вт}, \tag{4}$$

где W — энергия в джоулях, t — время в секундах. Для источников со сложной спектральной структурой излучения общий энергетический поток равен сумме составляющих его монохроматических потоков. Для непрерывного спектра (рис. 3) монохроматическим потоком излучения с длиной волны λ считается излучение, содержащее некоторый малый диапазон длин волн — от λ до $\lambda + d\lambda$.

Энергетический поток излучения $d\Phi_{э\lambda}$, приходящийся на малый спектральный интервал $d\lambda$, называется *спектральной плотностью* энергетического потока излучения:

$$\left|\frac{d\Phi_{э\lambda}}{d\lambda}\right|_{d\lambda\to 0} = \varphi_\lambda \text{ вт/см}. \tag{5}$$

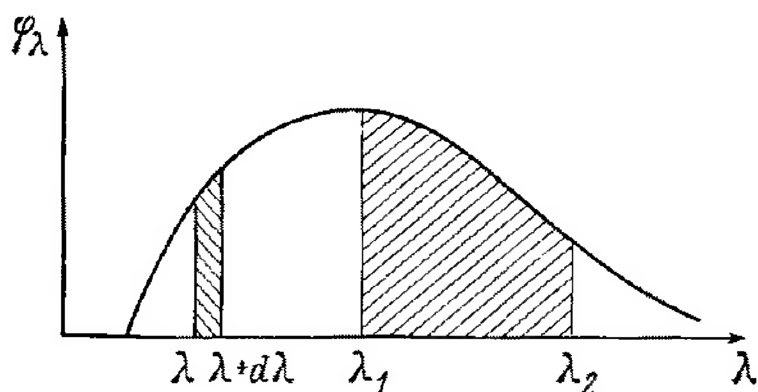


Рис. 3. Распределение спектральной плотности потока излучения.

Энергетический поток излучения в спектральном диапазоне от λ_1 до λ_2 равен

$$\Phi_{э\lambda_1-\lambda_2} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} d\Phi_{э\lambda} = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \varphi_\lambda d\lambda. \tag{6}$$

На рис. 3 этой величине равна площадь, ограниченная кривой $\varphi_\lambda = f(\lambda)$, осью абсцисс и ординатами λ_1 и λ_2.

2. Поверхностная плотность энергетического потока излучения характеризуется отношением величины потока к площади поверхности. Различают два вида поверхностной плотности: *энергетическую светность* и *энергетическую освещенность*. В первом случае поток $\Phi_э$ относят к площади источника s, во втором — к площади приемника σ, на который падает поток. В соответствии с этим определением энергетическая светность равна

$$R_э = \frac{d\Phi_э}{ds} \text{ вт/см}^2. \tag{7}$$

Энергетическая светность монохроматического излучения равна

$$R_{э\lambda} = r_\lambda d\lambda, \tag{8}$$

где r_λ — *спектральная плотность* энергетической светности.

В случае абсолютно черного тела спектральная плотность энергетической светности определяется формулой Планка:

$$r_{\lambda ч} = \frac{2\pi hc^2}{\lambda^5} \cdot \frac{1}{e^{\frac{hc}{k\lambda T}} - 1}, \tag{9}$$

где λ — длина волны; T — температура в град.; c — скорость света; h — постоянная Планка и $k = 1.38 \cdot 10^{-23}$ вт$\times$ $\times$сек./град. — постоянная Больцмана.

Если произвести расчеты по формуле (9) и на основании полученных данных построить графики, как это сделано на рис. 4, то становится очевидным, что для каждого температурного состояния абсолютно черного тела при определенной длине волны спектральная плотность энергетической светности имеет максимальное значение. Величина этой длины волны λ_m и соответствующая ей спектральная плотность r_{λ_m} определяются законом смещения Вина:

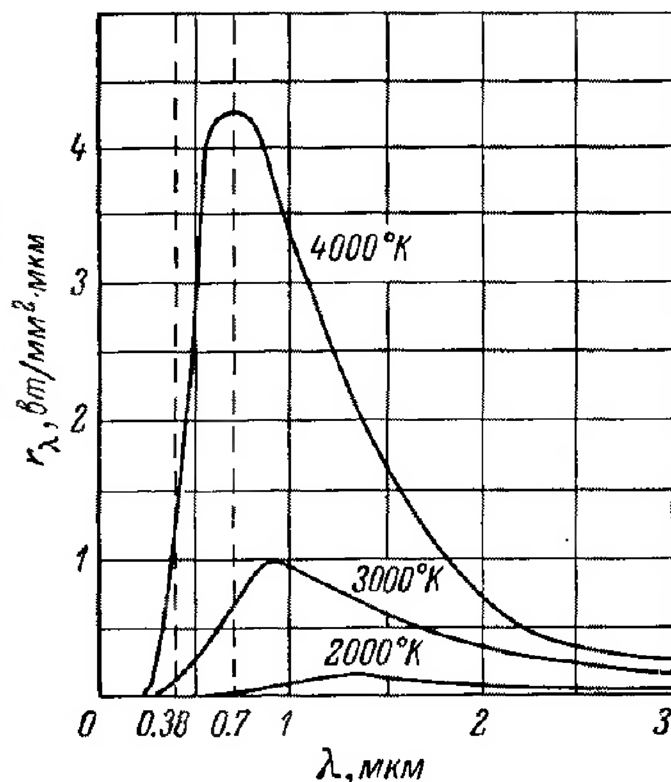


Рис. 4. Зависимость спектральной плотности энергетической светности от длины волны для абсолютно черного тела при различных температурах.

$$\lambda_m = \frac{2886}{T} \text{ мкм}, \tag{10}$$

$$r_{\lambda_m} = 1.301 \cdot 10^{-11} T^5 \text{ вт/см}^3.$$

Таким образом, можно рассчитать распределение энергии по спектру и спектральную плотность энергетической светности для абсолютно черного тела. На практике излучение какого-либо источника оценивается путем сравнения с излучением абсолютно черного тела, которое принимается за эталон.

3. Энергетическая освещенность по приведенному выше определению равна

$$E_э = \frac{d\Phi_э}{d\sigma} \text{ вт/см}^2. \tag{11}$$

Можно сказать, что энергетическая освещенность равна количеству лучистой энергии, падающей за 1 сек. на единицу площади освещаемой поверхности.

4. Количество энергии, полученное единицей площади поверхности при длительном освещении, называется *энергетическим количеством освещения* и равно

$$H_э = E_э t \text{ вт} \cdot \text{сек./см}^2. \quad (12)$$

5. Поток излучения имеет не только поверхностную, но и пространственную плотность. Если поток $d\Phi_э$ распространяется в телесном угле $d\omega$ (рис. 5), то его пространственная плотность, называемая *энергетической силой света*, равна

$$I_э = \frac{d\Phi_э}{d\omega} \text{ вт./стер.} \quad (13)$$

Следует заметить, что на практике часто предпочтительней пользоваться плоскими углами. Плоский угол u и телесный ω, представляющий собой тело вращения угла u вокруг одной из его сторон, связаны соотношением

$$\omega = 2\pi (1 - \cos u). \quad (14)$$

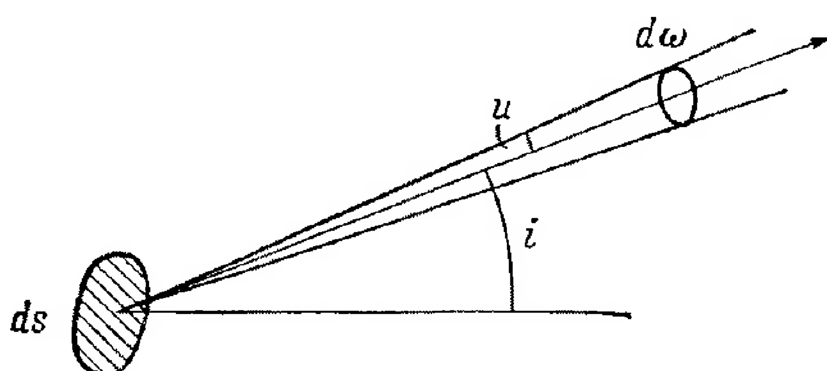


Рис. 5. К понятиям о силе света, телесном угле и яркости.

6. Последняя основная характеристика излучения связана с направлением его распространения. Отношение энергетической силы света элемента излучающей поверхности к площади проекции этого элемента на плоскость, перпендикулярную направлению распространения излучения, называется *энергетической яркостью.* Согласно сказанному, она равна

$$B_э = \frac{dI_э}{ds \cos i} \text{ вт/см}^2 \cdot \text{стер.} \quad (15)$$

или, применяя (13),

$$B_э = \frac{d\Phi_э}{d\omega ds \cos i}, \quad (16)$$

где i — угол между нормалью к поверхности ds и осью телесного угла $d\omega$, в котором распространяется поток $d\Phi_э$.

Таким образом, энергетическая яркость в общем случае зависит от угла направления излучения. Особенно сильно она меняется с изменением угла у глянцевых поверхностей. Для хорошо рассеивающих поверхностей значение энергетической яркости при изменении направления излучения изменяется мало.

Матовые рассеивающие поверхности, у которых энергетическая яркость постоянна по всем направлениям, называются идеально рассеивающими *поверхностями Ламберта.* Если на такую поверхность падает поток излучения, то некоторая часть этого потока рассеивается поверхностью в полусферу. Энергетическая яркость отражающей поверхности Ламберта связана с освещенностью от падающего на нее потока следующим образом:

$$B_{эо} = \rho \frac{E_э}{\pi}, \quad (17)$$

где ρ — коэффициент отражения поверхности.

Световые единицы введены для характеристики излучений и их проявлений в *видимой* области спектра. Световые величины аналогичны

рассмотренным выше фотометрическим величинам и обозначаются теми же буквами, но без индекса «э».

В качестве основной единицы принята единица силы света, названная свечой (св). Эталоном силы света служит полный излучатель, создающий поток излучения по законам абсолютно черного тела при температуре затвердевания платины, находящейся внутри этого излучателя. Его светящаяся площадка размером в 1 см^2 имеет силу света вдоль нормали, равную 60 св. Производные единицы приведены в табл. 1. Распространенная прежде единица яркости — стильб и новая — нит связаны соотношением 1 сб = 10^4 нт; 1 нт = 10^{-4} сб. Остальные световые единицы в микрофотографии практически не применяются.

ТАБЛИЦА 1

Основные световые единицы, установленные Международной системой единиц измерения (СИ)

Наименование величины	Единица измерения	Обозначение	Размер единицы
Сила света	свеча	св	(1 св)
Световой поток	люмен	лм	(1 св)·(1 стер).
Яркость	нит	нт	(1 св) : (1 м^2)
Освещенность	люкс	лк	(1 лм) : (1 м^2)
Количество освещения	люкс-секунда	лк·сек.	(1 лк)·(1 сек.)

2. НЕКОТОРЫЕ СВЕДЕНИЯ ИЗ ФИЗИЧЕСКОЙ ОПТИКИ

Распространение излучения в материальной среде

В физической оптике под точечным источником излучения понимают такой источник, размер которого исчезающе мал по сравнению с расстоянием, на котором рассматриваются вызываемые излучением явления.

Если источник окружен оптически однородной средой, то излучение распространяется во все стороны с одинаковой скоростью. За определенный промежуток времени колебания пройдут одинаковые расстояния и образуют в пространстве *сферическую* волну, все точки которой находятся в одинаковой фазе. Рассматривая малую часть волны на большом удалении от источника, можно пренебречь ее кривизной, и тогда говорят о *плоской* волновой поверхности. Нормаль к волновой поверхности, т. е. направление распространения волны, называют *лучом*, хотя, с точки зрения физики, энергия не может распространяться вдоль одной линии. Всегда существует *пучок лучей*, образующий световой конус, ось которого называют *главным лучом*.

В любой материальной среде, оптически более плотной, чем вакуум, излучение распространяется со скоростью $c_{ср}$, меньшей скорости света в пустоте. Отношение скоростей

$$c/c_{ср} = n \qquad (18)$$

есть *показатель преломления* данной среды. Так как в общем случае излучения разных длин волн распространяются в средах с разными скоростями, то величина показателя преломления зависит от длины волны λ, т. е. показатель преломления имеет *дисперсию*.

Кроме того, каждая среда, в зависимости от ее физических свойств, в какой-то мере поглощает (абсорбирует) проходящее через нее излу-

чение. Для характеристики этого свойства введен *коэффициент пропускания*

$$\tau = \frac{\Phi'}{\Phi}, \qquad (19)$$

причем Φ' — световой поток, прошедший через среду; Φ — световой поток, вошедший в среду.

На практике часто удобней пользоваться величиной, называемой *плотностью*, которая равна

$$D = -\lg \tau. \qquad (20)$$

Абсорбционную способность среды характеризуют также *коэффициентом поглощения*, равным отношению поглощенного потока к падающему, т. е.

$$a = \frac{\Phi_{пог}}{\Phi}. \qquad (21)$$

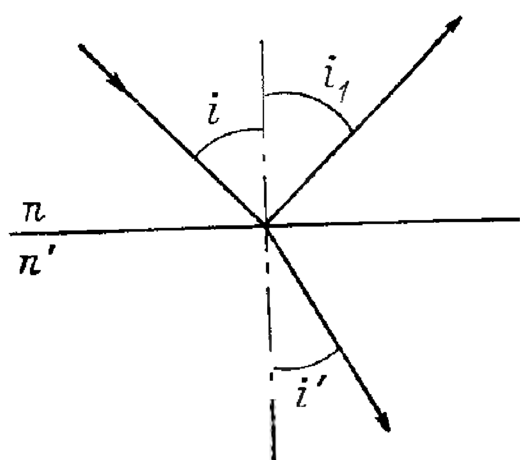


Рис. 6. Прохождение и отражение излучения на границе раздела двух сред.

Соотношения коэффициентов пропускания и оптической плотности приведены в приложении I.

Если на пути потока излучения встречается граница раздела двух сред с разными показателями преломления, то часть энергии отражается от границы, а часть проходит через нее (преломляется), изменив направление движения (рис. 6). При этом выполняются следующие законы:

1) падающий, отраженный и преломленный лучи лежат в одной плоскости с нормалью, проведенной в точку падения луча к границе раздела (эта плоскость называется *плоскостью падения*);

2) *угол падения* равен *углу отражения*:

$$i = i_1; \qquad (22)$$

3) *угол падения* i, *угол преломления* i' и показатели преломления двух граничащих сред связаны равенством

$$n \sin i = n' \sin i'. \qquad (23)$$

Количественное соотношение между энергиями отраженной и преломленной волны зависит от угла падения и ориентации плоскости колебания волны относительно плоскости падения. Связь амплитуды падающей a, отраженной a_1 и преломленной a' волны выражается формулами Френеля:

для волны с колебаниями, параллельными плоскости падения:

$$a_1 = a\frac{\operatorname{tg}(i - i')}{\operatorname{tg}(i + i')}, \qquad a' = a\frac{2\sin i' \cos i}{\sin(i - i')\cos(i + i')},$$

для волны с колебаниями, перпендикулярными плоскости падения:

$$a_1 = a\frac{\sin(i - i')}{\sin(i + i')}, \qquad a' = a\frac{2\sin i' \cos i}{\sin(i - i')}. \qquad (24)$$

При нормальном падении света формулы упрощаются:

$$a_1 = -a\frac{n' - 1}{n' + 1}; \quad a' = a\frac{2}{n' + 1}. \qquad (25)$$

Из графиков на рис. 7 следует, что если интенсивность отраженного света с колебаниями, перпендикулярными плоскости падения, непре-

рывно растет при увеличении угла падения, то интенсивность света с колебаниями, параллельными плоскости падения, сначала убывает до минимума, а затем возрастает. Минимум имеет место при угле, определяемом *законом Брюстера*:

$$\operatorname{tg} i_Б = n'. \tag{26}$$

В случае перехода света из оптически более плотной среды в менее плотную ($n > n'$) при угле падения, определяемом выражением

$$\sin i_{по} = n'/n, \tag{27}$$

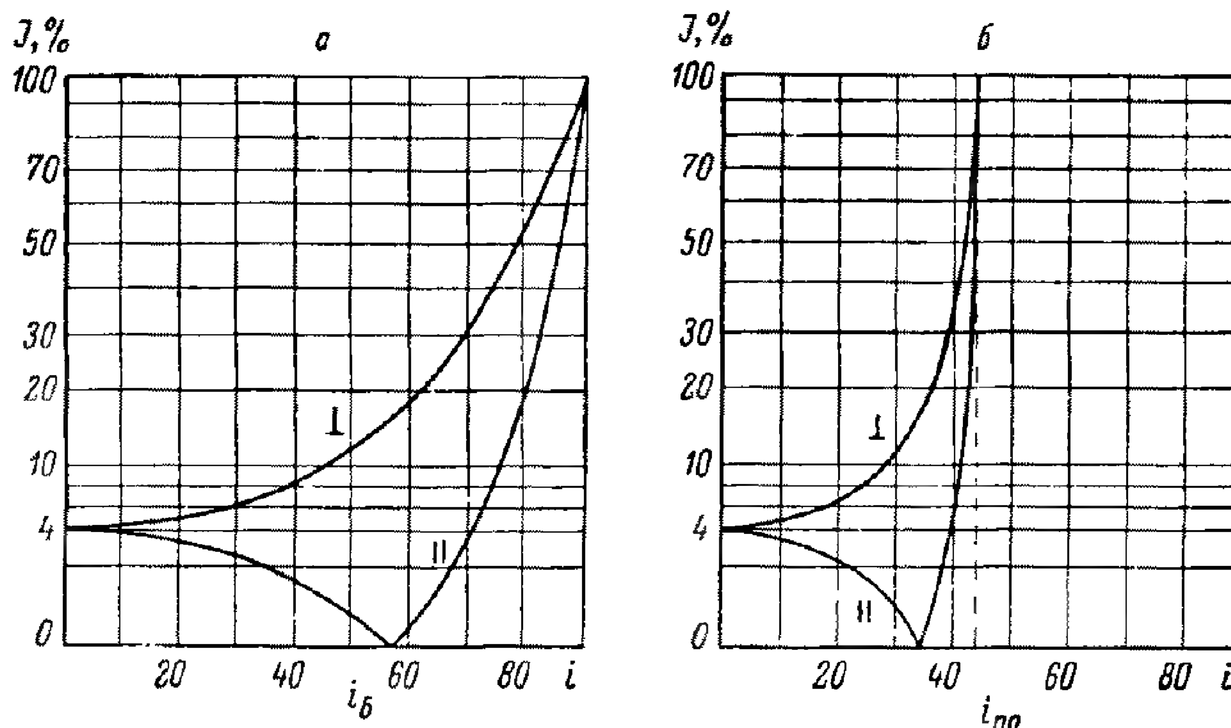


Рис. 7. Зависимость интенсивности отраженного света J от угла падения i.

$а$ — при $n < n'$; $б$ — при $n > n'$.

наступает *полное внутреннее отражение*, т. е. при бóльших углах свет не проходит через границу раздела.

Коэффициент отражения

$$\rho = \frac{\Phi_1}{\Phi} \tag{28}$$

равен отношению отраженного потока к падающему и зависит от физических свойств среды.

Интерференция

Каждый элементарный излучатель источника света испускает колебания в виде отдельных цугов волн. Акт испускания одного цуга длится около 10^{-8} сек., а длина цуга составляет несколько миллионов длин световых волн. Акты испускания следуют друг за другом в статистическом беспорядке, т. е. распределение фаз волновых колебаний во времени носит случайный характер. У различных элементарных излучателей не только фазы колебаний, но и длины волн в общем случае имеют случайное распределение. Поэтому интерферировать друг с другом могут только волны одного цуга, называемые *когерентными*. При этом имеется в виду настолько длительная интерференция, что глаз способен ее заметить.

Явление *интерференции* представляет собой сложение двух когерентных волн, в результате которого возникает третья волна (рис. 8, *а*). Ее амплитуда и фаза зависят, в частности, от того, насколько одна из первоначальных волн опережает другую, т. е. от величины разности хода Δ или разности фаз δ между ними. Эти разности связаны соотношением

$$\delta = 2\pi\Delta/\lambda$$

Амплитуда a результирующей волны связана с амплитудами a_1 и a_2 интерферирующих волн и разностью фаз δ между ними следующим образом:

$$a = \sqrt{a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2 \cos\delta}. \quad (29)$$

Амплитуда a может иметь значение от (a_1+a_2) при $\delta=0$ до (a_1-a_2) при $\delta=\pi$. Таким образом, интенсивность результирующей волны в зависимости от различных условий меняется и при этом возникают интерференционные полосы, которые бывают двух видов.

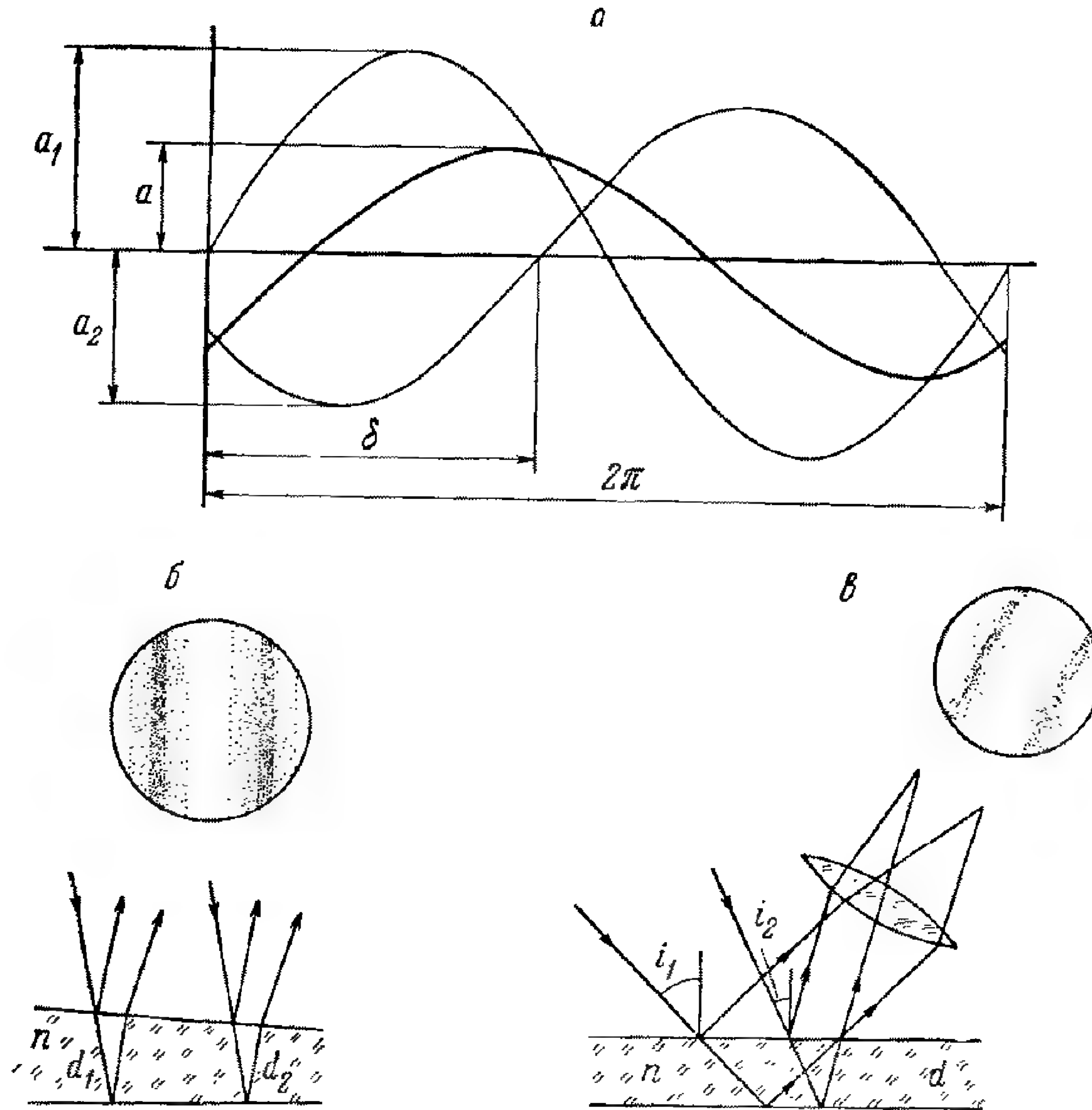


Рис. 8. Интерференция света.

а — сложение двух волн; *б* — образование полос равной толщины; *в* — образование полос равного наклона.

1. *Интерференционные полосы равной толщины* наблюдаются обычно в тонких слоях какого-либо вещества (рис. 8, *б*). Свет, падая на пленку, частично отразится от верхней поверхности, а частично от нижней, т. е. из одного луча возникнут два когерентных луча. Один луч отстанет от другого. Разность хода между ними определится толщиной d пленки в этом месте и показателем преломления n:

$$\Delta = 2nd. \quad (30)$$

Введя целое число m, называемое *порядком интерференции* или номером полосы, можно установить те места на пленке, где будут наблюдаться темные полосы:

$$d = \frac{(2m+1)\,\lambda/2}{2n} \quad (31)$$

и светлые полосы:

$$d = \frac{m\lambda/2}{n}. \qquad (32)$$

Эти светлые и темные места образуют интерференционную картину, локализованную в плоскости пленки. Интерференционные максимумы и минимумы для других длин волн будут наблюдаться в других местах пленки. По мере увеличения толщины пленки разности хода лучей растут, цвета перемешиваются и интерференционная картина пропадает. Интерференцией света объясняется окраска масляных и нефтяных пленок на воде, цвета побежалости на закаленной стали, окраска поверхности некоторых минералов, насекомых и т. д.

2. *Интерференционные полосы равного наклона* возникают при постоянной толщине пленки или пластинки и при переменном угле падения (рис. 8, *в*). Аналогично предыдущему, каждый луч света порождает два луча, способных интерферировать друг с другом. Если с помощью линзы эти лучи свести вместе, то они образуют светлую полосу для тех углов падения, при которых разность хода равна четному числу полуволн:

$$m\lambda/2 = d\sqrt{n^2 - \sin i^2}. \qquad (33)$$

Для образования темных полос необходимо условие

$$(2m + 1)\,\lambda/2 = 2d\sqrt{n^2 - \sin i^2}. \qquad (34)$$

Полосы равного наклона локализованы в бесконечности. Для лучей других длин волн максимумы и минимумы образуются при других углах падения.

Поляризация

Колебания волн одного цуга, возникшего при единичном акте испускания, совершаются в одной плоскости, т. е. колебания *линейно поляризованы*. Ориентация колебаний множества цугов беспорядочна, и в этом случае говорят о *естественном свете*. Если каким-либо образом из естественного света отфильтрованы колебания, лежащие в одной плоскости, то получается линейно поляризованный свет.

Две линейно поляризованные волны могут взаимодействовать друг с другом, когда их колебания совершаются в разных плоскостях (рис. 9). Если две волны *I* и *II* распространяются в направлении, указанном стрелкой (случай *а*), и разность фаз между ними $\delta=0$ (соответствует разности хода $\Delta=0$), то след пересечения результирующей волны *III*, двигающейся в том же направлении со скоростью света, с плоскостью, перпендикулярной направлению распространения, будет прямой линией. Волна *III* — линейно поляризована. Если разность хода между волнами *I* и *II* равна $\Delta=\lambda/4$ (случай *в*), то след пересечения результирующей волны *III* с перпендикулярной плоскостью будет поворачиваться по часовой стрелке, оставаясь все время одинаковой длины. Волна *III* имеет *круговую поляризацию*. В случае *б* след пересечения результирующей волны с плоскостью поворачивается по часовой стрелке, меняясь по длине. Волна имеет *эллиптическую поляризацию*. Результаты отдельных вариантов взаимодействия представлены случаями *г*—*з*. Явления поляризации встречаются в природе очень часто.

Выше рассматривалось распространение света в оптически однородных средах, называемых *изотропными*. Среды, у которых оптические свойства неодинаковы по различным направлениям, называются *анизотропными*. Оптическая анизотропия обусловлена структурой и физико-

химическими свойствами вещества. Она имеет следующие основные виды.

1. Если плоскополяризованный луч падает на объект, обладающий *двойным лучепреломлением*, то внутри объекта он, в общем случае, разделяется на два луча, поляризованные во взаимно перпендикулярных направлениях. Показатели преломления для этих лучей не равны друг другу, поэтому лучи распространяются в анизотропной среде с разными

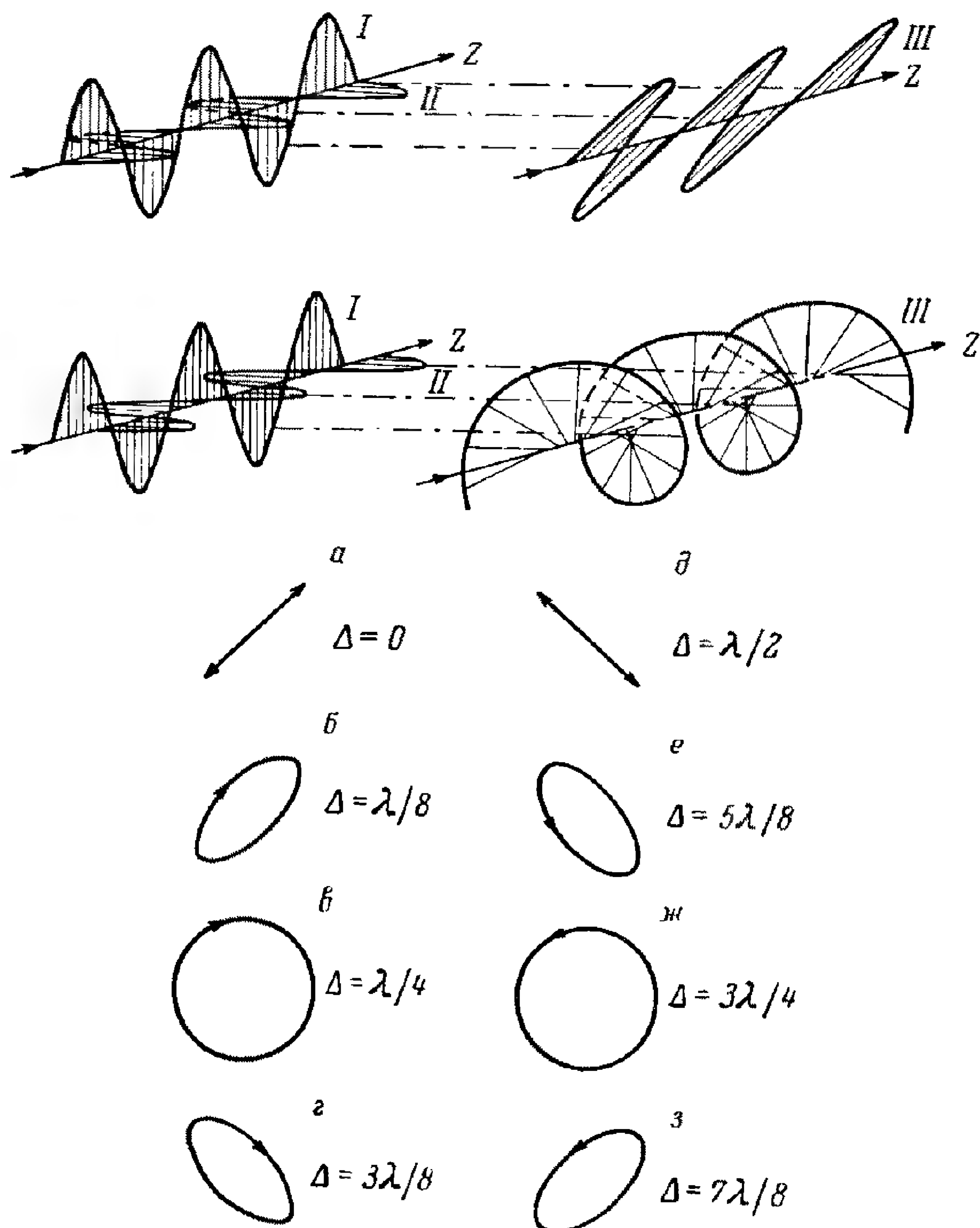


Рис. 9. Интерференция поляризованных волн при различных разностях хода.

скоростями. В результате по выходе из объекта они будут иметь некоторую разность фаз, пропорциональную разности показателей преломления и толщине препарата. Различают два вида объектов: одноосные и двуосные. В первых существует одно направление, вдоль которого оба луча распространяются с одинаковыми скоростями; во вторых таких направлений — два. Эти направления называют *оптическими осями*, а плоскость, проходящую через падающий луч и оптическую ось,— *главным сечением*. В случае одноосного объекта луч, электрический вектор которого перпендикулярен главному сечению, имеет для всех направлений один и тот же показатель преломления и подчиняется закону преломления. Это — *обыкновенный* луч. Для луча с электрическим вектором, лежащим в плоскости главного сечения, показатель преломления зависит от направления. Этот луч не подчиняется закону преломления и может выйти

из плоскости падения. Он называется *необыкновенным* лучом. В двуосных объектах показатель преломления для обоих лучей зависит от направления распространения. Максимальная разность показателей преломления необыкновенного n_e и обыкновенного n_0 луча характеризует величину двойного лучепреломления. В зависимости от знака этой разности одноосные объекты разделяют на положительные и отрицательные.

Величина двойного лучепреломления, а также угол между оптическими осями и их положение в пространстве имеют дисперсию, т. е. изменяются с длиной волны света.

2. Анизотропия поглощения — *плеохроизм* — проявляется в том, что свет, проходящий через среду, поглощается по-разному в зависимости от ориентации плоскости поляризации и от направления распространения. Так как плеохроизм имеет дисперсию, то в зависимости от направления свет различных длин волн поглощается средой в разной степени. Это влечет за собой изменение окраски плеохроичного объекта с изменением направления.

У оптически активных веществ встречается круговой плеохроизм — различное поглощение для света, поляризованного по кругу вправо, и для света, поляризованного по кругу влево.

За меру плеохроизма принимают величину $\eta = (\alpha_{\parallel} - \alpha_{\perp})/(\alpha_{\parallel} + \alpha_{\perp})$, где $\alpha_{\parallel}$ и $\alpha_{\perp}$ — коэффициенты поглощения света, поляризованного соответственно параллельно и перпендикулярно главному сечению.

3. Некоторые вещества обладают так называемой *оптической активностью*, т. е. способностью поворачивать плоскость поляризации проходящего через них света. Угол поворота плоскости поляризации прямо пропорционален длине пути и зависит от рода среды, в которой распространяется свет.

Оптическая активность, как и другие анизотропные явления, имеет дисперсию. Дисперсия оптической активности очень чувствительна к различным изменениям в молекулярных структурах, к колебаниям внешней температуры и давления и к другим изменениям.

Люминесценция

Люминесценция, которая заключается в способности веществ испускать излучение при воздействии на них внешней энергии, называемой энергией возбуждения, бывает нескольких видов. Излучение люминесценции представляет собой избыток над тепловым излучением вещества при данной температуре и имеет длительность, значительно превышающую период световых волн.

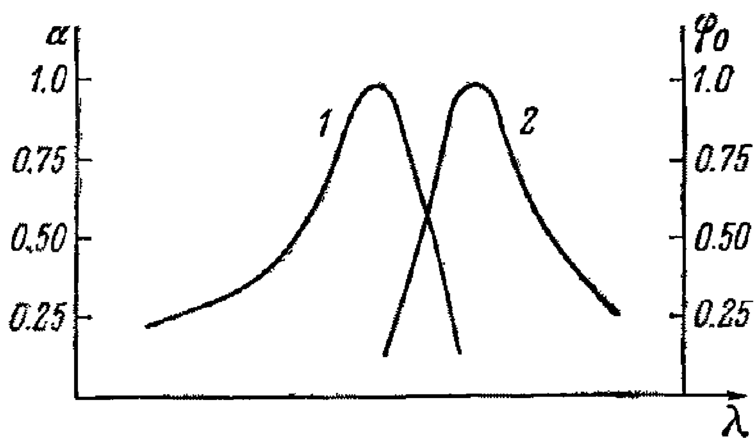


Рис. 10. Графическая интерпретация закона Стокса.

Излучение люминесценции характеризуется спектральным распределением плотности лучистого потока, степенью поляризации, выходом люминесценции (отношение излучаемой энергии к поглощенной) и временем затухания. Все эти характеристики обусловлены природой вещества. На выход люминесценции влияет, в частности, степень тушения, зависящая как от структуры самого вещества, так и от внешних условий.

Фотолюминесценция возбуждается электромагнитным излучением видимой или ультрафиолетовой областей спектра. Ее условно подразделяют на *флуоресценцию*, т. е. свечение со временем затухания, не превышаю-

щим 10^{-8} сек., и *фосфоресценцию*, которая продолжается более длительное время после прекращения возбуждения.

Спектры возбуждающего излучения и флуоресценции связаны законом Стокса, графическое представление которого иллюстрировано графиками на рис. 10. Кривая *1* характеризует абсорбционную способность объекта (α — коэффициент поглощения), а кривая *2* — энергетическую плотность потока φ_λ флуоресценции. Обе кривые выражены в относительных единицах. По оси абсцисс отложена длина волны света. Из рисунка видно, что спектр флуоресценции и его максимум смещены в более длинноволновую сторону относительно спектра поглощения. Следовательно, энергия кванта, излучаемого флуоресцирующим веществом, меньше энергии кванта поглощаемого света, возбуждающего свечение. В небольшой области перекрытия кривых вещество может поглощать и излучать свет одной и той же длины волны.

Спектр флуоресценции остается неизменным при любой длине волны возбуждающего излучения. Квантовый выход флуоресценции в соответствии с законом Вавилова также не зависит в определенном интервале от длины волны возбуждающего излучения.

Поляризация флуоресценции встречается не только в анизотропных, но и в изотропных средах, возбуждаемых поляризованным светом.

3. ОСНОВНЫЕ ЗАКОНЫ ГЕОМЕТРИЧЕСКОЙ ОПТИКИ

В геометрической оптике, в отличие от волновой, оперируют светящейся точкой как бесконечно малым источником излучения и исходящими из этой точки пучками световых лучей, представляющих собой нормали к волновой поверхности. Пучок лучей, имеющий общую точку пересечения, называют *гомоцентрическим*, а саму точку — центром пучка.

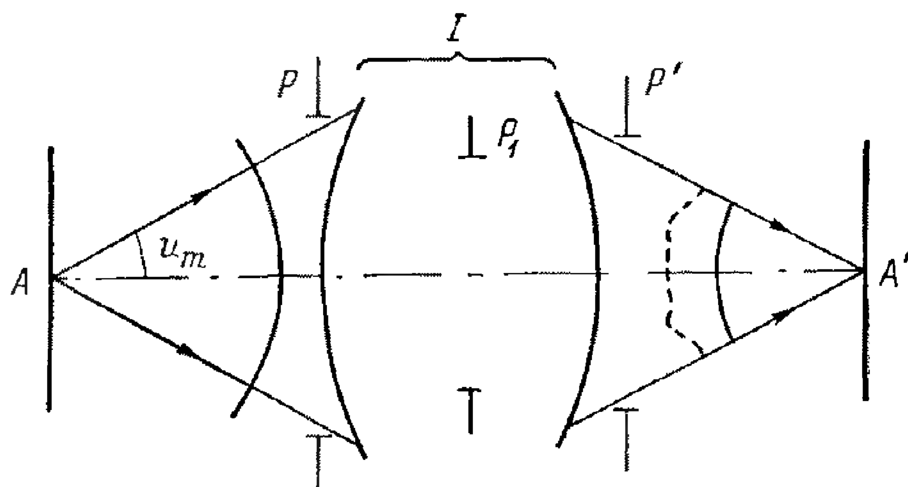


Рис. 11. Изображение точки оптической системой.

Центр пучка, входящего в оптическую систему, называют предметной точкой, а центр пучка, выходящего из системы, — *изображением* предметной точки. С таких позиций любой предмет и его изображение можно представить совокупностью предметных точек и их изображений.

Пространство перед оптической системой называют *пространством предметов*, а за оптической системой — *пространством изображений*. Отрезкам, откладываемым против направления движения света и вниз от оси симметрии системы (если свет идет слева), приписывают знак минус (—). Отрезки вправо и вверх имеют знак плюс (+). Углы, отсчитываемые против часовой стрелки, считаются отрицательными, по часовой — положительными. Если какая-либо точка или отрезок в пространстве предметов обозначены некоторой буквой, то соответствующие и аналогичные точки или отрезки в пространстве изображений обозначают той же буквой с добавлением штриха (например, F и F').

Часть сферической волны (рис. 11), испущенной светящейся точкой A, вступив в идеальную оптическую систему I, выйдет из нее в виде сферической волны, сходящейся в точке A'. Последняя является идеальным изображением точки A.

Оптическая система состоит из некоторого количества оптических элементов, размеры которых ограничены. Вследствие этого в образовании изображения, как видно из рисунка, участвует не вся сферическая волна, выходящая из точки на оси, а только ее некоторая часть, размер которой определяется наименьшей оправой системы или наименьшей диафрагмой, называемой *действующей*, или *апертурной*, *диафрагмой*. Она может находиться перед системой, внутри или позади системы.

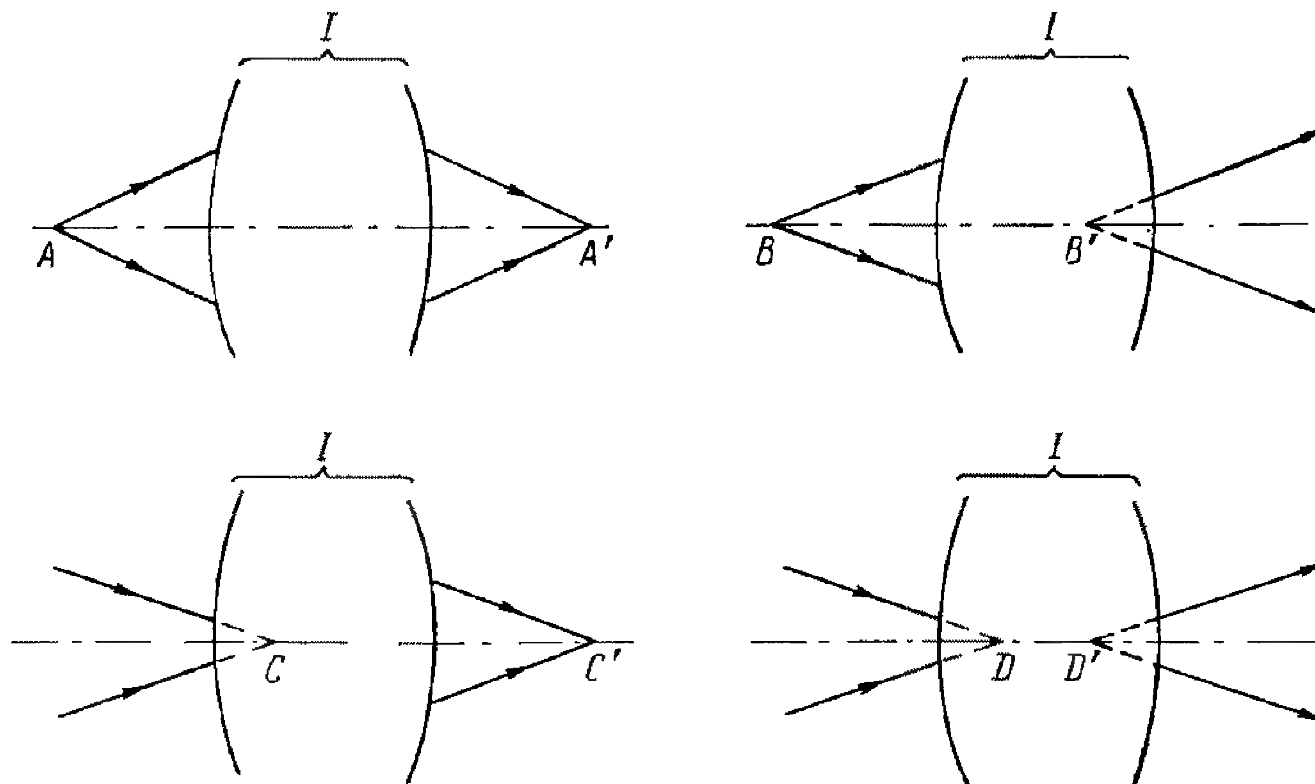


Рис. 12. Действительные и мнимые предметные точки и их изображения.

A, A', B, C' — действительные точки; B', C, D, D' — мнимые точки; *I* — оптическая система.

На рисунке показан случай, когда апертурная диафрагма P_1 расположена внутри. Ее изображение оптической системой в пространстве предметов называется *входным* зрачком P. Изображение этой диафрагмы в пространстве изображений называется *выходным* зрачком P'. Из всех лучей, испускаемых точкой A, в систему попадут только те, которые находятся внутри конуса, опирающегося на входной зрачок. Половина угла при вершине этого конуса называется *апертурным углом* u_m.

При наличии оптической системы лучи гомоцентрического пучка либо действительно проходят через его центр, либо через центр проходят воображаемые продолжения лучей. В первом случае центр называется *действительной* точкой, во втором — *мнимой*. Возможные варианты действительных и мнимых предметных точек и их изображений показаны на рис. 12, где оптическая система представлена двумя преломляющими поверхностями.

Если пучок лучей, параллельных оптической оси, после прохождения оптической системы со стороны пространства предметов сходится в одной точке (или в точке пересекаются продолжения лучей), то эта точка является *задним фокусом* системы и обозначается F'. Аналогично, *передний фокус* F — это точка на оси, характерная тем, что вышедший из нее расходящийся пучок лучей после оптической системы станет параллельным. Плоскости, проведенные через фокусы перпендикулярно оптической оси, называют *передней и задней фокальными плоскостями*.

На рис. 13 оптическая система, условно представленная первой (I) и последней (II) поверхностями, образует изображение $A'B'$ предмета AB. Отношение их размеров называют *линейным увеличением* (или просто увеличением) системы:

$$V = A'B'/AB. \tag{35}$$

Если сравнительно близко расположенная к изображению $A'B'$ точка A_1' есть изображение точки A_1, то отношение отрезков $A_1'A'$ к A_1A представляет *продольное увеличение* системы, которое равно

$$Q = A_1'A/A_1A = V^2. \tag{36}$$

Существует пара сопряженных плоскостей, для которых линейное увеличение равно +1. Эти плоскости называют *передней и задней глав-*

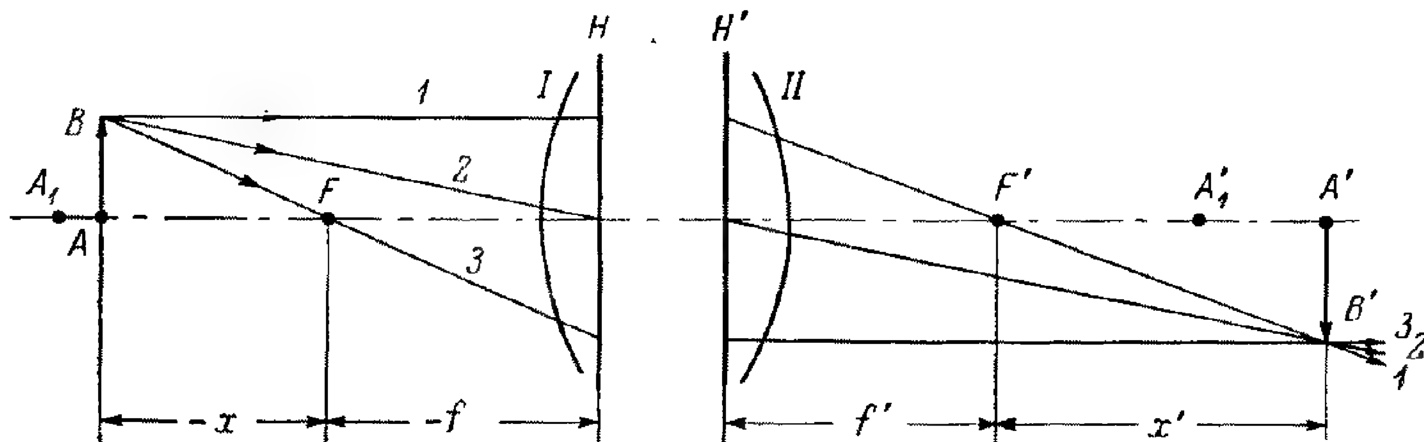


Рис. 13. Построение изображения предмета, образованного оптической системой.

ными плоскостями и обозначают H и H'. Их особенность та, что луч, пересекший плоскость H на некотором расстоянии от оси при входе в оптическую систему, пересечет плоскость H', выйдя из системы, на том же расстоянии от оси.

Удаление фокуса F от передней главной плоскости H — это *переднее фокусное расстояние* f, а удаление точки F' от плоскости H' — *заднее фокусное расстояние* f' оптической системы.

Для того чтобы построить изображение точки B, надо воспользоваться двумя из трех лучей, показанных на рисунке. Луч 1 проведен параллельно оптической оси, и по выходе из системы он пройдет через ее задний фокус. Луч 2 проведен в переднюю главную точку, после системы он пойдет из задней главной точки параллельно входящему. Наконец, луч 3, проведенный через передний фокус системы, после нее будет параллелен оптической оси. $A'B'$ есть изображение предмета AB.

Взаимное расположение и размеры предмета и изображения связаны формулой Ньютона

$$xx' = -f'^2 \tag{37}$$

и формулой

$$V = -\frac{f}{x} = -\frac{x'}{f'}, \tag{38}$$

где x — расстояние от переднего фокуса до предмета, x' — расстояние от заднего фокуса до изображения.

В оптических приборах применяются главным образом призмы, зеркала и линзы со сферическими поверхностями. Если одиночная линза находится в воздухе, то ее переднее и заднее фокусные расстояния равны друг другу, а их величина определяется показателем преломления мате-

риала линзы, ее толщиной d, радиусом кривизны r_1 первой и r_2 второй поверхности:

$$f' = -f = \frac{n r_1 r_2}{(n-1)\,[n\,(r_2 - r_1) + d\,(n-1)]}. \tag{39}$$

Иногда удобно пользоваться понятием *оптическая сила линзы*, которая равна

$$\Phi = 1/f'. \tag{40}$$

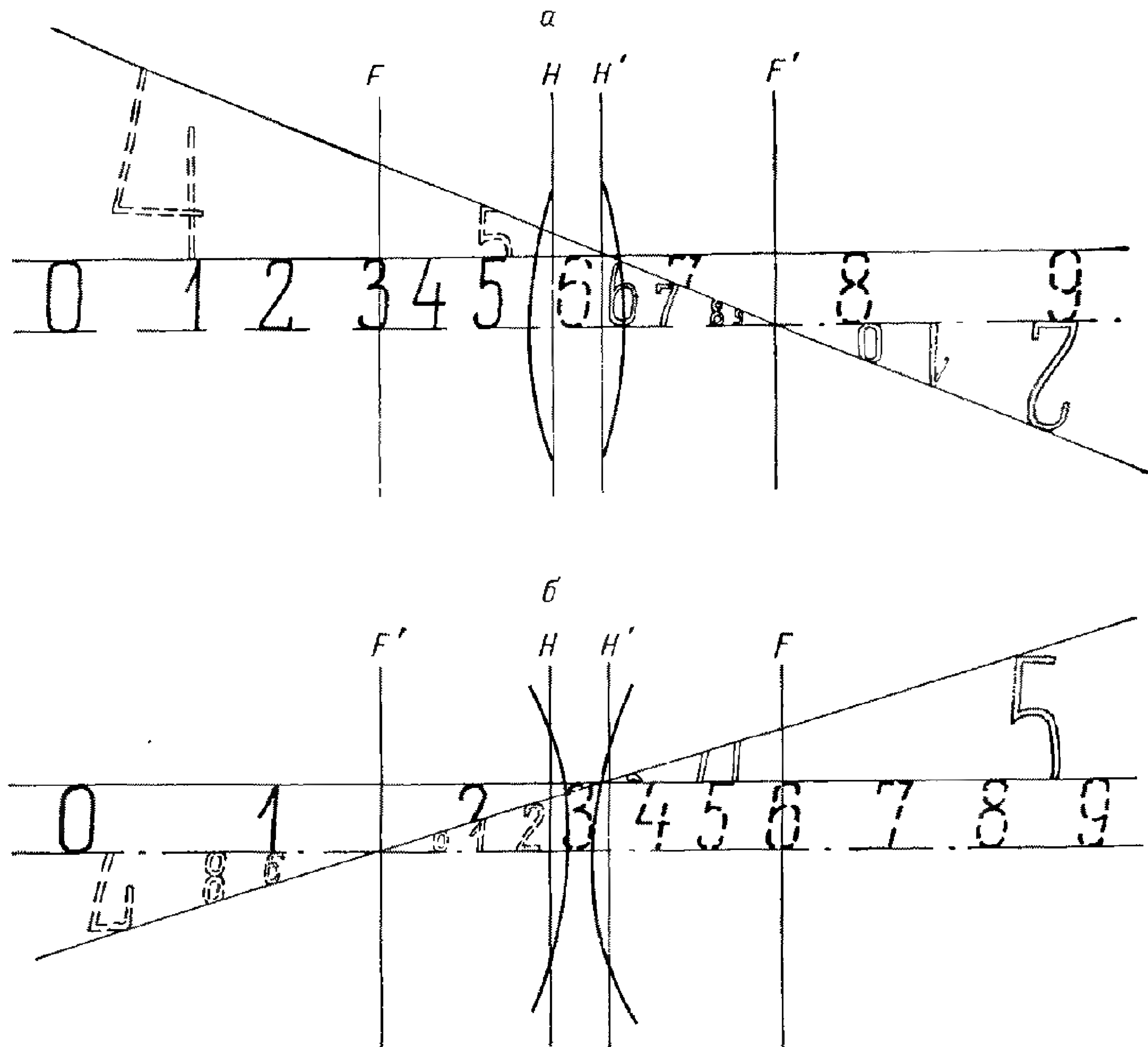


Рис. 14. Взаимное расположение предмета (*жирные цифры*) и его изображение (*контурные цифры*).

а — в случае положительной оптической системы; *б* — в случае отрицательной оптической системы.

Фокусное расстояние двух линз (или двух оптических систем), установленных друг за другом, определяется выражением

$$f = \frac{f_1 f_2}{\Delta}, \tag{41}$$

где Δ — расстояние от заднего фокуса первой линзы до переднего фокуса второй линзы, называемое оптическим интервалом, или *оптической* длиной; f_1 и f_2 — фокусные расстояния первой и второй линз соответственно.

Если оптическая система превращает параллельный пучок лучей в сходящийся, то она называется *положительной*, если в расходящийся — *отрицательной*. На рис. 14 показаны различные случаи взаимного расположения предмета и его изображения, причем мнимые предметы и изображения показаны штриховыми линиями, а действительные — сплошными. Из рисунка видно, что при перемещении предмета вдоль оси его изображение двигается в ту же сторону.

4. ДИФРАКЦИЯ И ЕЕ РОЛЬ В ОБРАЗОВАНИИ ИЗОБРАЖЕНИЯ

В однородной среде свет распространяется прямолинейно. Но при прохождении света вблизи края непрозрачного тела или в среде, имеющей резкие неоднородности показателя преломления, часть энергии определенным образом изменяет первоначальное направление движения и отклоняется в сторону. Это явление называется *дифракцией*, а отклонившийся свет — *дифрагированным светом*.

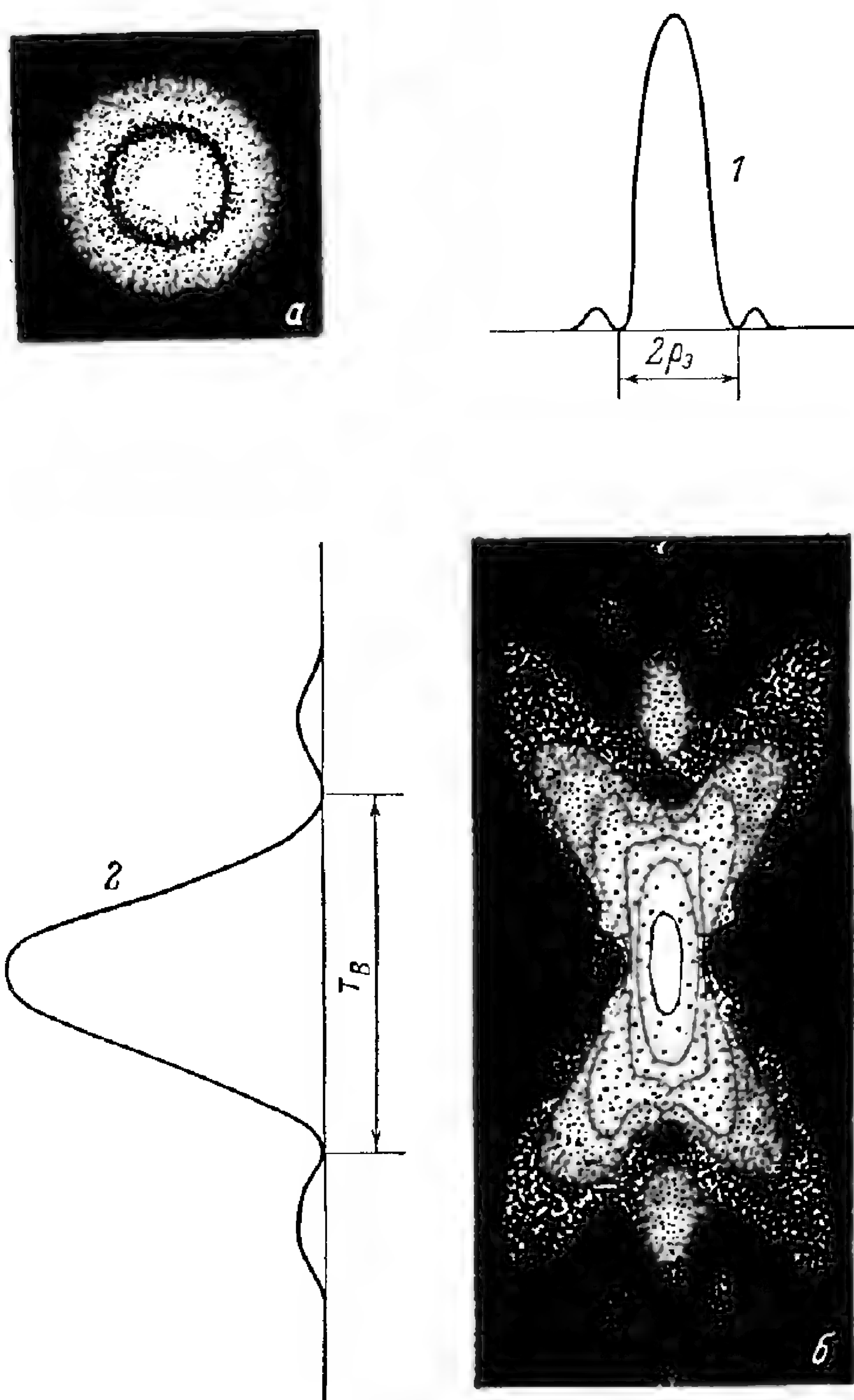


Рис. 15. Дифракционное изображение светящейся точки.

а — диск Эри; б — сечение плоскостью, проходящей через оптическую ось, и распределение освещенности: 1 — плоскости изображения по диаметру диска Эри, 2 — вдоль оптической оси.

Очевидно, что дифракция имеет место в любой оптической системе, так как последняя состоит из линз в оправах и диафрагм. По этой причине изображение светящейся точки даже в идеальной оптической системе представляет собой не точку, а светлый диск конечного размера, окруженный темными и светлыми кольцами. Этот диск носит название *диска Эри* (рис. 15, *а*). В нем сосредоточено около 84% всей световой энергии изображения. Диаметр диска Эри зависит только от длины световой

волны, апертурного угла в пространстве изображений u'_m и формы выходного зрачка; при круглом зрачке диаметр равен

$$2\rho_Э = \frac{1.22\lambda}{\sin u'_m}, \tag{42}$$

если изображение находится в воздухе.

Далее, изображение точки — не плоская, а пространственная фигура, и ее протяженность вдоль оптической оси равна (в пределах первого минимума освещенности)

$$T_В = \frac{4\lambda}{\sin^2 u'_m}. \tag{43}$$

На рис. 15, *б* показано сечение пространственной фигуры, представляющей дифракционное изображение точки и распределение освещенности перпендикулярно (кривая *1*) и вдоль (кривая *2*) оптической оси. Кривые построены в относительных единицах. Так, освещенность в центре диска Эри принята за 100; тогда освещенность первого светлого кольца составляет 1.75, второго — 0.42. Масштабы пространственной фигуры вдоль и перпендикулярно оптической оси значительно отличаются друг от друга.

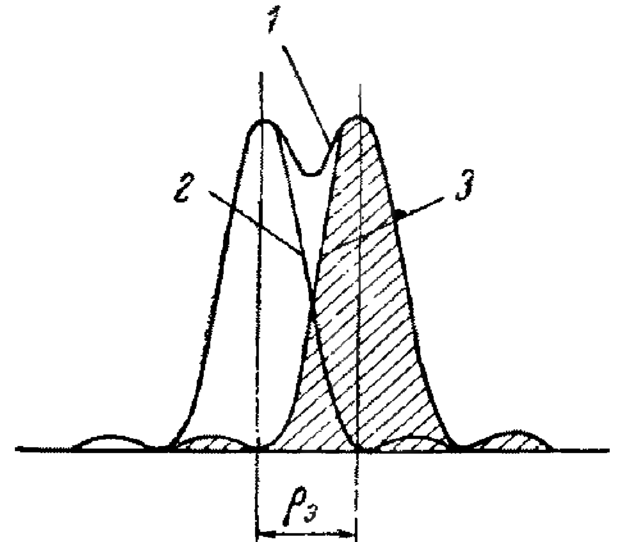


Рис. 16. Разрешающая способность.

Факт существования диска Эри обусловливает следующую существеннейшую характеристику оптического прибора — его *разрешающую способность*. Изображения двух соседних точек различимы как два отдельных изображения при условии, что расстояние между ними будет не меньше некоторой определенной величины. Эта величина служит мерой разрешающей способности, которая по критерию Рэлея равна радиусу диска Эри, т. е.

$$\delta' = \rho_Э = \frac{0.61\lambda}{\sin u'_m}. \tag{44}$$

В таком случае (рис. 16) результирующая кривая *1* распределения освещенности в изображении (сумма кривых *2* и *3* распределения освещенностей в изображении каждой точки) имеет два максимума и минимум между ними, причем освещенность в минимуме составляет 77.5% от максимальной.

5. АБЕРРАЦИИ ОПТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Реальная оптическая система обладает недостатками, искажающими изображение в той или иной мере. Эти недостатки называются *аберрациями* и проявляются в том, что изображение предмета становится нерезким, деформированным или окрашенным. При конструировании оптических систем количество линз, их формы и размеры, сорта стекол и расстояние между линзами подбирают таким образом, чтобы остаточные аберрации были малы и вызываемые ими дефекты изображения не имели бы практического значения.

Оценить качество изображения в оптическом приборе можно легко доступным способом — наблюдением вида дифракционного изображения точки. Объектом для этой цели служит стеклянная пластинка, покрытая, например, тонким зеркальным слоем алюминия. Пластинку устанавливают в световом потоке и смотрят «на просвет». Маленькие отверстия в слое алюминия выполняют роль светящихся точек, служащих пред-

метом наблюдения. В случае хорошо исправленной оптической системы (т. е. при минимальных аберрациях) изображение точки видно в виде светлого маленького диска, окруженного слабым светлым кольцом (рис. 17, *а*).

В микроскопии чаще всего сталкиваются со следующими аберрациями.

Сферическая аберрация поясняется на рис. 11. Если световая волна после прохождения оптической системы (показана штриховой линией) не имеет сферической формы, то ее нормали не пересекутся в одной точке. Следовательно, каждая точка предмета изображается не в виде точки (здесь и далее под точечным изображением подразумевается диск Эри), а в виде кружка рассеяния большего или меньшего размера. Изображения соседних точек начинают накладываться друг на друга и изображение всего предмета становится нерезким. В дифракционной

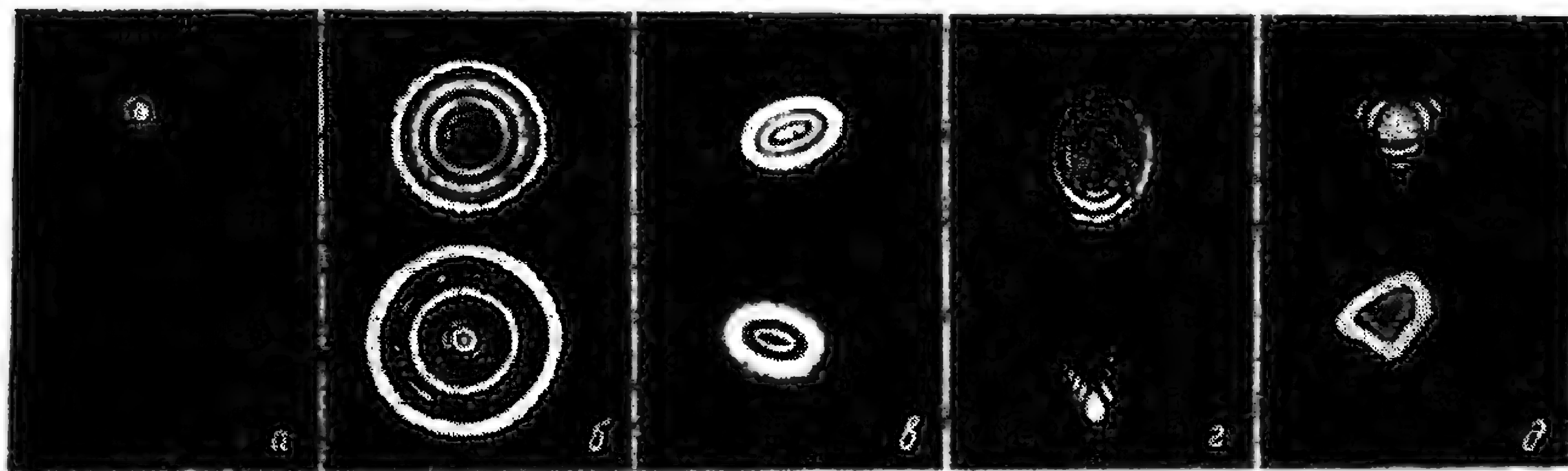


Рис. 17. Дифракционные изображения точки.

а — в случае хорошо исправленной оптической системы; *б* — при сферической аберрации; *в* — при астигматизме; *г* — при коме; *д* — при деформации линз.

картине (рис. 17, *б*) наблюдается перераспределение энергии: яркость диска падает, а яркость окружающих его колец возрастает. Из дальнейшего будет видно, что сферическая аберрация встречается в практике микрофотографии даже при работе с хорошо исправленными оптическими системами.

Астигматизм проявляется в том, что изображение точки, лежащей не на оси оптической системы, представляется не точкой, а двумя взаимно перпендикулярными отрезками, расположенными в разных плоскостях. Посередине между этими плоскостями световой пучок имеет форму круга. Считается, что такой круг лежит в плоскости наилучшей фокусировки. При наличии астигматизма диск Эри и окружающие его кольца превращаются в эллипсообразную фигуру (рис. 17, *в*). Свободную от астигматизма систему называют анастигматической.

Кома заключается в нарушении симметрии светового пучка, идущего из внеосевой точки, в результате чего появляется односторонняя деформация изображения точки (рис. 17, *г*). Если в оптической системе устранены кома и сферическая аберрация, то систему называют *апланатической*.

Кривизна поля изображения приводит к тому, что изображение плоского предмета расположено не на плоской, а на кривой поверхности вращения. Поэтому при фокусировке на центр поля зрения края поля остаются нерезкими, и наоборот.

Дисторсия возникает в тех случаях, когда линейные увеличения в центре и на краях поля зрения не равны друг другу. Это приводит к нарушению подобия между предметом и его изображением. Оптическую систему, в которой дисторсия отсутствует, называют *ортоскопической*.

Все перечисленные аберрации имеют место при любой длине световой волны. Так как материалы, из которых изготавливают оптические детали, обладают дисперсией, то существуют также хроматические аберрации.

Хроматическая аберрация состоит в том, что изображение, созданное зелеными лучами, не совпадает с изображениями, созданными красными и синими лучами. Несовпадение, а следовательно, и аберрации бывают двух видов.

1) *Хроматизм положения.* Изображения различных цветов имеют одинаковую величину, но находятся на различных расстояниях от оптической системы. В этом случае контуры контрастных объектов имеют нерезкую слабо окрашенную кайму. Если аберрация исправлена так, что изображения двух цветов приведены в одну плоскость, то систему называют *ахроматической.* У таких систем в изображении объектов цветные каймы хотя и малы, но все еще заметны.

У *апохроматической* системы в одной плоскости находятся изображения трех цветов. Изображение практически бесцветное.

2) *Хроматизм увеличения.* Изображения различных цветов находятся в одной и той же плоскости, но имеют различную величину. При этом контуры контрастных объектов, расположенных у краев поля зрения, окружены ярко окрашенными синими или красными каймами.

Наконец, *деформация* линз также приводит к ухудшению качества изображения. Один из возможных видов искажения дифракционного изображения точки за счет деформации линз показан на рис. 17, *д.*

6. ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛАЗА

Зрительное восприятие — это сложный акт, в котором участвуют глаза и определенные элементы нервной системы и мозга. Здесь сообщается лишь о тех характеристиках зрительного аппарата, опираясь на которые в микроскопии и микрофотографии делаются те или иные выводы и заключения.

Аккомодация — это способность глаза приспосабливаться так, чтобы четко видеть предмет, удаленный на то или иное расстояние. Считается, что без большого утомления нормальный глаз может длительно наблюдать предметы на расстоянии от бесконечно большого до $p=250$ мм. Последнее называют *расстоянием наилучшего виденья.* Для близорукого или дальнозоркого глаза в случае необходимости вводят соответствующую коррекцию.

Спектральная чувствительность глаза зависит от длины волны (рис. 141). Глаз реагирует на поток излучения в диапазоне длин волн от 380 до 770 нм, причем монохроматические излучения, имеющие равные мощности, вызывают различные световые ощущения, которые отличаются не только по цвету, но и по силе. Наиболее чувствителен глаз к монохроматическому излучению с длиной волны 555 нм.

Пороговая чувствительность глаза зависит от степени его *адаптации.* В зависимости от яркости наблюдаемых предметов диаметр *зрачка* глаза изменяется от 1.5 до 8 мм. После длительного нахождения в темноте глаз реагирует на протяженный объект с яркостью не ниже 10^{-7} нт. Яркость, превышающая 0.1 мнт, вызывает ослепление глаза. Для сравнительной оценки указанных величин можно привести следующие данные. Если освещенность листа белой бумаги равна 50 лк, то его яркость будет около 13 нт. Тот же лист, освещенный солнцем, имеет яркость 13 кнт.

Пороговая контрастная чувствительность глаза характеризуется тем минимальным контрастом предмета на некотором фоне, при котором

предмет может быть обнаружен. Контраст объекта на фоне определяется выражением

$$K = \frac{B - B_ф}{B_ф} = \frac{\Delta B}{B_ф}, \qquad (45)$$

где B — яркость объекта; $B_ф$ — яркость фона. Контрастная чувствительность глаза зависит от яркости и достигает максимального значения 0.02 при яркостях 80—320 нт.

Разрешающая способность глаза, или *острота зрения*, оценивается тем наименьшим угловым расстоянием между двумя точками, на котором эти точки видны раздельно. Острота зрения зависит от яркости, контраста и цвета объекта. При освещенности объекта около 50 лк и высоком контрасте острота лежит в пределах

$$2' < \varepsilon < 4', \qquad (46)$$

но может достигать величины $\varepsilon = 1'$. С уменьшением освещенности или контраста острота зрения падает.

Стереоскопическое зрение заключается в способности видеть предметы объемными при наблюдении их двумя глазами. Так как глаза смотрят на один и тот же предмет под несколько различными углами, то изображение в одном глазу несколько отличается от изображения в другом. Психологическое восприятие этого факта вызывает объемное представление о предмете. Если искусственным путем поменять местами изображения, подаваемые в левый и правый глаз (или перевернуть их), то возникает псевдостереоэффект: дальние точки предмета будут казаться расположенными ближе, а ближние — дальше.

Глава II

ОСНОВНЫЕ СВЕДЕНИЯ ИЗ ТЕОРИИ МИКРОСКОПА

Невооруженный глаз с остротой зрения $\varepsilon=2'$, наблюдая хорошо освещенный предмет с расстояния наилучшего видения $p=250$ мм, может различать отдельные детали размером не менее $p\,\varepsilon=0.15$ мм. Это достаточно малая величина при сравнении ее, например, с газетным или журнальным клише, у которых растр лежит в пределах 0.2—0.4 мм.

Наблюдение более мелких деталей и с большей разрешающей способностью осуществляется с помощью микроскопа, который дает увеличенное изображение предмета (называемого также объектом или препаратом). Угловые размеры деталей этого изображения, рассматриваемого глазом, удовлетворяют выражению (46).

1. УВЕЛИЧЕНИЕ И ХОД ЛУЧЕЙ В МИКРОСКОПЕ

Увеличение микроскопа представляет до некоторой степени условную величину, под которой принято понимать (рис. 18) отношение размеров изображений l'_1 и l'_2 одного и того же препарата l, полученных на сетчатке глаза при наблюдении соответственно невооруженным глазом с расстояния $p=250$ мм и через микроскоп I (представлен первой и последней поверхностями оптической системы). Так как величины l'_1 и l'_2 характеризуются тангенсами угловых размеров предмета w и изображения w', то, согласно данному определению, увеличение микроскопа равно

$$\Gamma=\frac{\operatorname{tg} w'}{\operatorname{tg} w}. \qquad (47)$$

В соответствии с рисунком тангенс углового размера предмета равен

$$\operatorname{tg} w=\frac{l}{p}. \qquad (48)$$

Из рисунка ясно также, что если глаз находится в заднем фокусе микроскопа (на деле это чаще всего имеет место), то тангенс углового размера изображения будет равен

$$\operatorname{tg} w'=\frac{l}{f'}. \qquad (49)$$

Из этих трех формул можно найти увеличение микроскопа:

$$\Gamma=\frac{p}{f'}=\frac{250}{f'}. \qquad (50)$$

Микроскоп, как это видно из схемы (рис. 19), где представлен ход лучей, имеет оптическую систему с двумя ступенями увеличения: первая осуществляется объективом, вторая — окуляром. Объектив *2* и окуляр *5*

здесь условно показаны в виде одиночных линз, тогда как на самом деле они представляют собой более или менее сложные системы. Препарат *1* находится перед объективом на расстоянии, несколько большем фокусного

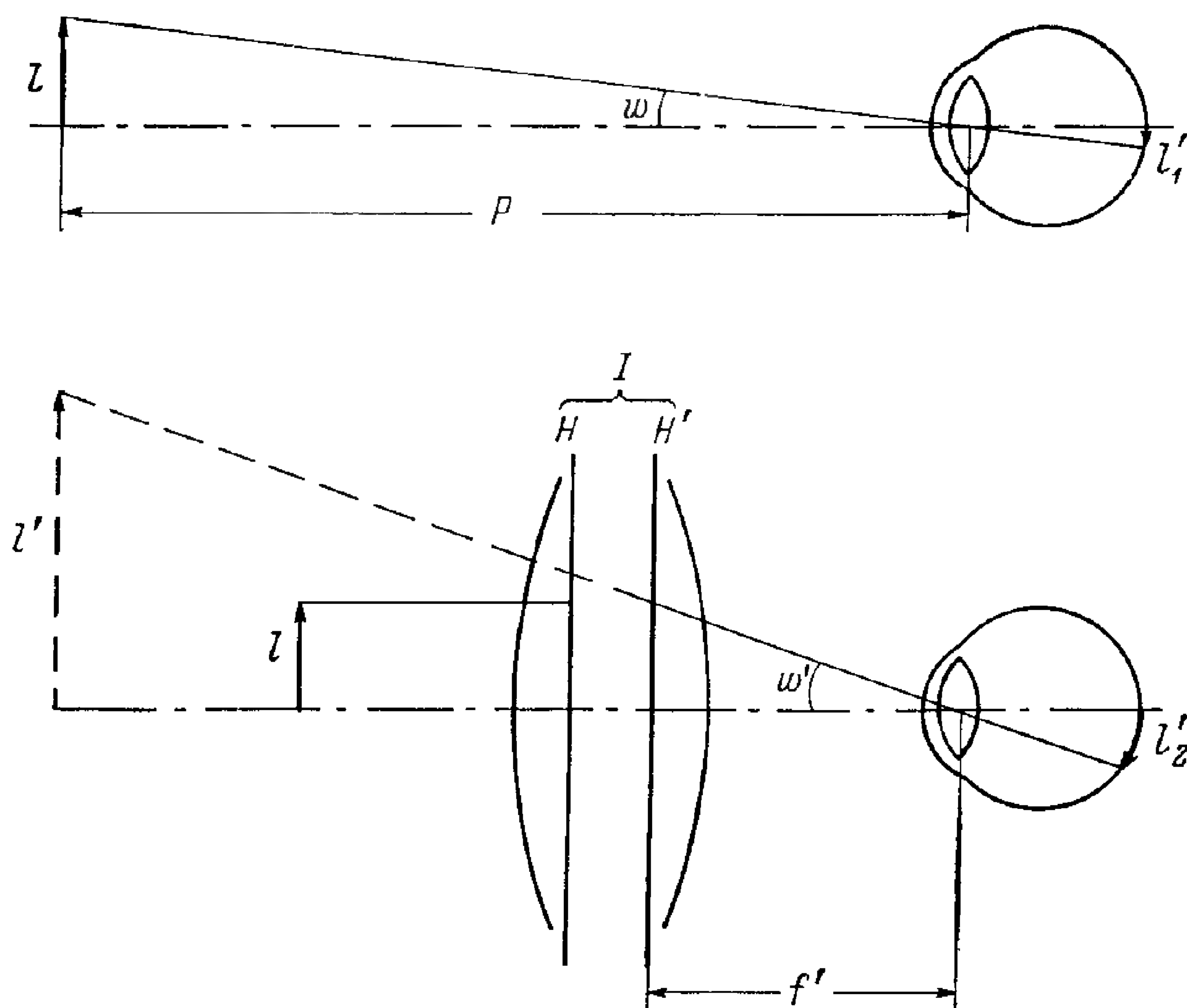


Рис. 18. К понятию об увеличении микроскопа.

расстояния $f_{об}$ объектива. Объектив образует действительное увеличенное и перевернутое изображение *1'* препарата в плоскости, лежащей вблизи переднего фокуса $F_{ок}$ окуляра *5* на расстоянии, несколько меньшем фокус-

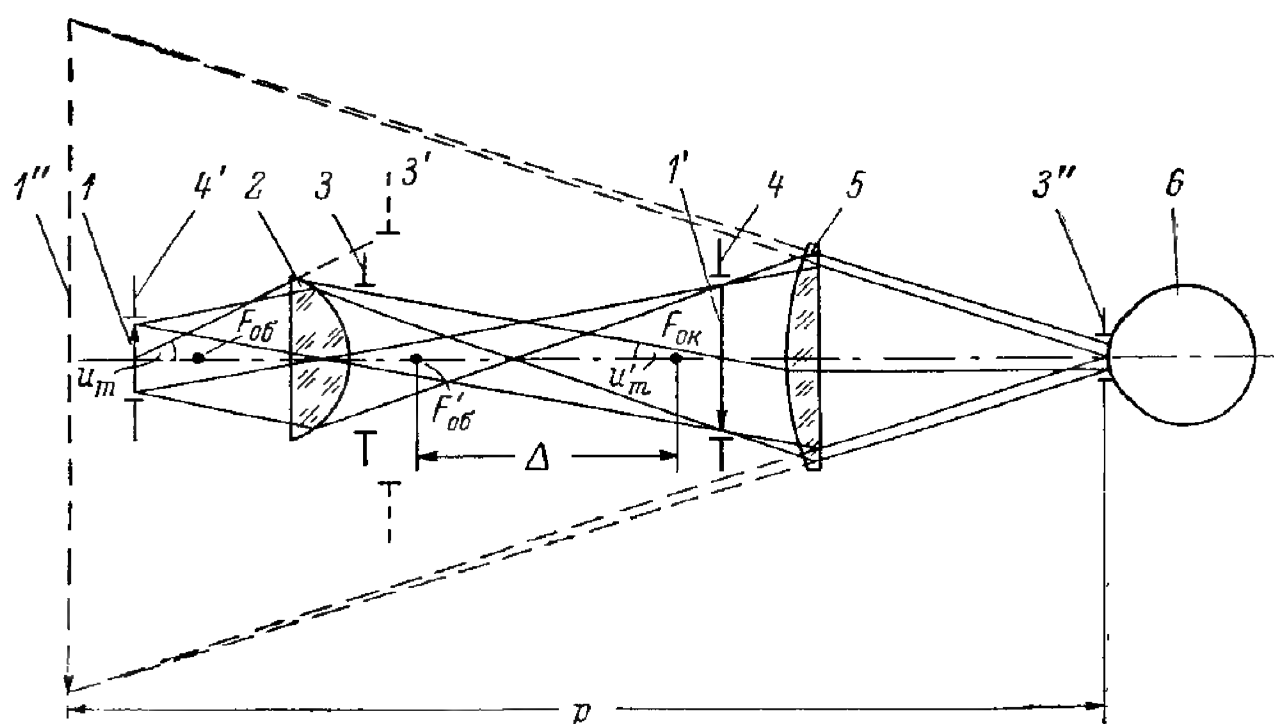


Рис. 19. Принципиальная схема микроскопа и ход лучей в нем.

ного расстояния. Промежуточное изображение *1'* является для окуляра предметом, и он образует вторично увеличенное мнимое и прямое изображение *1''*, которое, как условно принято считать, расположено от глаза наблюдателя *6* на расстоянии наилучшего видения *p* (или больше, в зависимости от особенностей глаза и его аккомодации). В результате микроскоп дает изображение, перевернутое относительно препарата.

Расстояние от заднего фокуса объектива $F'_{об}$ до переднего фокуса окуляра $F_{ок}$, обозначенное Δ, называют *оптической длиной тубуса* микроскопа.

Согласно формуле (41), заднее фокусное расстояние микроскопа равно

$$f' = -\frac{f'_{об} f'_{ок}}{\Delta}. \qquad (51)$$

Если для примера взять средней силы объектив с фокусным расстоянием $f'_{об}=4.32$ мм (расчетная оптическая длина тубуса $\Delta=173$ мм) и окуляр с фокусным расстоянием $f'_{ок}=25$ мм, то подсчитанное по формуле (51) фокусное расстояние микроскопа оказывается $f'=0.62$ мм.

Можно показать, что передние фокусы микроскопа и объектива практически совпадают друг с другом, а задний фокус микроскопа расположен очень близко от заднего фокуса окуляра. Для приведенного выше примера расстояния между указанными парами фокусов соответственно составляют около 0.1 и 3.5 мм.

Благодаря сравнительно большой оптической длине тубуса расстояние от заднего фокуса микроскопа до предметной плоскости настолько велико, что обеспечивается удобство работы. С другой стороны, *рабочее расстояние* (от первой поверхности объектива до препарата) даже у объективов с наименьшим фокусом достаточно для помещения покровного стекла, закрывающего препарат. Оставшийся при этом промежуток между объективом и покровным стеклом называют *свободным расстоянием*.

В ряде случаев в плоскости промежуточного изображения на расстоянии Δ от заднего фокуса объектива помещается сетка (например, шкала или перекрестие, нанесенное на плоско-параллельной стеклянной пластинке). Сетка служит для измерения размеров препарата, центрирования или других целей. В микрофотографических приборах она необходима для фиксирования плоскости фокусировки при наводке на резкость. Если сетка совпадает с передней фокальной плоскостью окуляра, как это следует из принципиальной схемы микроскопа, то ее изображение может наблюдаться только нормальным глазом, так как лучи от какой-либо точки сетки выходят из окуляра параллельным пучком.

Не вдаваясь в подробности, следует сказать, что для близорукого глаза лучи из окуляра должны выходить расходящимся пучком, для дальнозоркого — сходящимся. При этих условиях изображение сетки сможет наблюдать глаз, аккомодационная способность которого отличается от нормальной. Для обеспечения такой возможности окуляр должен перемещаться вдоль оптической оси. Перемещение окуляра на одну диоптрию равно

$$X = \frac{f'^2_{ок}}{1000}, \qquad (52)$$

где $f'_{ок}$ — фокусное расстояние окуляра, в мм. Обычно окуляры такого типа могут перемещаться на ± 5 диоптрий.

Если в формуле (50) величину f' заменить по формуле (51), то увеличение микроскопа будет

$$\Gamma = -\frac{p\Delta}{f'_{об} \cdot f'_{ок}} = -\frac{\Delta}{f'_{об}} \cdot \frac{p}{f'_{ок}}. \qquad (53)$$

Знак «минус» здесь указывает на то, что изображение, образованное микроскопом, перевернуто по отношению к наблюдаемому предмету.

Анализируя рис. 19 и применив формулу (38), можно определить, что увеличение объектива равно

$$V_{об} = -\frac{\Delta}{f'_{об}}. \qquad (54)$$

Здесь знак минус имеет тот же смысл, что и в предыдущей формуле, а вся правая часть представляет собой не что иное, как первый множитель в формуле (53). Так как окуляр микроскопа работает аналогично тому, как показано на рис. 18, то его увеличение будет

$$\Gamma_{\text{ок}} = \frac{p}{f'_{\text{ок}}}, \tag{55}$$

что равно второму множителю в формуле (53), которую теперь можно записать в виде

$$\Gamma = V_{\text{об}}\Gamma_{\text{ок}}. \tag{56}$$

Это наиболее употребительное выражение для определения общего увеличения микроскопа, которое равно произведению увеличения объектива

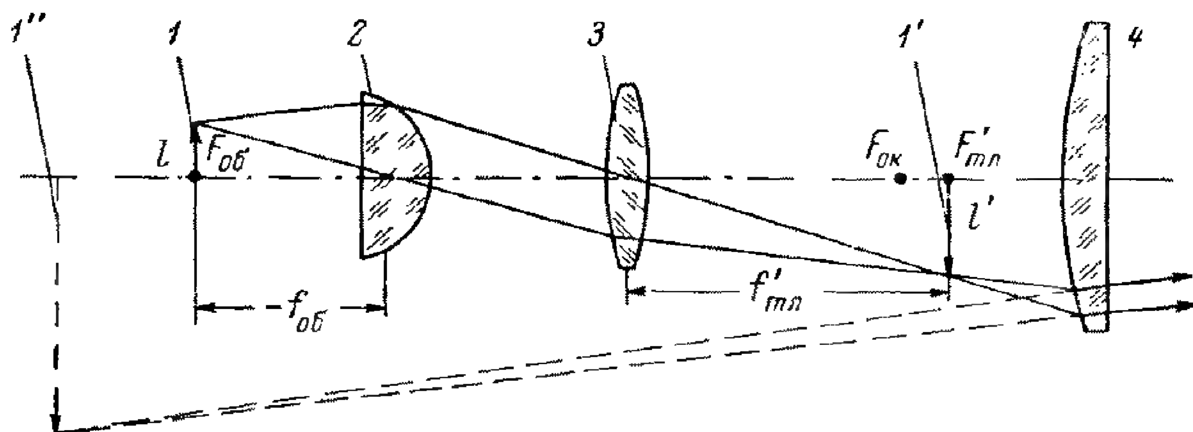


Рис. 20. Ход лучей в микроскопе с тубусной линзой.

на увеличение окуляра. Увеличения объективов и окуляров гравируются на их оправах, а также указываются во всех справочниках, и поэтому подсчитать увеличение микроскопа не представляет большого труда.

Некоторые типы объективов, как это подробнее будет показано ниже, рассчитываются и работают таким образом, что промежуточное изображение, созданное ими, проектируется не в фокальную плоскость окуляра, а на бесконечно большое расстояние. Оптическая длина тубуса этих объективов равна, как принято называть, бесконечности (∞).

В этом случае (рис. 20) препарат *1* помещается в передней фокальной плоскости $F_{\text{об}}$ объектива *2*. Из объектива выходит параллельный пучок лучей. Для того чтобы перепроектировать изображение, созданное объективом, из бесконечности в фокальную плоскость $F_{\text{ок}}$ окуляра *4* (или в в плоскость, близкую к ней, как показано на рисунке), за объективом помещают *тубусную линзу 3*, задняя фокальная плоскость которой $F'_{\text{тл}}$ находится вблизи плоскости $F_{\text{ок}}$. В плоскости $F'_{\text{тл}}$ образуется промежуточное изображение *1'* препарата, которое рассматривается обычным образом через окуляр *4*.

Из построений на рисунке можно найти увеличение системы объектив—тубусная линза:

$$V_{\text{об. тл}} = -\frac{l'}{l} = -\frac{f'_{\text{тл}}}{f'_{\text{об}}}. \tag{57}$$

Общее увеличение всего микроскопа в этом случае будет равно

$$\Gamma = V_{\text{об. тл}} \cdot \Gamma_{\text{ок}} = -\frac{f'_{\text{тл}}}{f'_{\text{об}}} \cdot \frac{p}{f'_{\text{ок}}}. \tag{58}$$

Для объективов, рассчитанных на длину тубуса ∞, на их оправах и в справочниках указывается фокусное расстояние объектива. Фокусное расстояние тубусной линзы дается в описаниях тех микроскопов, где такая линза имеется.

Если сравнить формулы (53) и (58), то очевидно, что для объективов, рассчитанных на длину тубуса ∞, фокусное расстояние тубусной линзы играет роль оптической длины тубуса.

Тот факт, что в системе микроскопа применено двухступенное увеличение, дает возможность варьировать увеличение прибора в больших пределах, комбинируя различные объективы и окуляры. Существенно также, что увеличение микроскопа можно изменять, не трогая объектив и меняя только окуляры, что часто бывает удобно в работе.

2. ОГРАНИЧЕНИЕ СВЕТОВЫХ ПУЧКОВ В МИКРОСКОПЕ

Увеличение микроскопа — не единственная его главная характеристика. Она зависит только от взаимного расположения препарата, объектива, окуляра и величины фокусных расстояний, но не связана с диаметрами диафрагм и оправ линзовых систем. Диаметры оправ и диафрагм определяют другие основные характеристики микроскопа: светосилу прибора, его разрешающую способность и поле зрения.

Действующей апертурной диафрагмой в микроскопе служит оправа одной из линз объектива.

Если между первой (фронтальной) линзой объектива *1* (рис. 21) и предметом *3* находится среда *2* с показателем преломления n' (левая часть рисунка), то апертурный угол в среде равен u'_m, тогда как в воздухе (правая часть рисунка) он равен u_m. Эти углы по закону преломления связаны формулой $n \sin u_m = n' \sin u'_m$. Ввиду того что после вхождения света в систему обе половины рисунка симметричны относительно оси, они энергетически эквивалентны, т. е. $\sin u_m$ в воздухе эквивалентно значение $n' \sin u'_m$ в среде с показателем преломления n'. Аббе назвал эту величину *численной апертурой*:

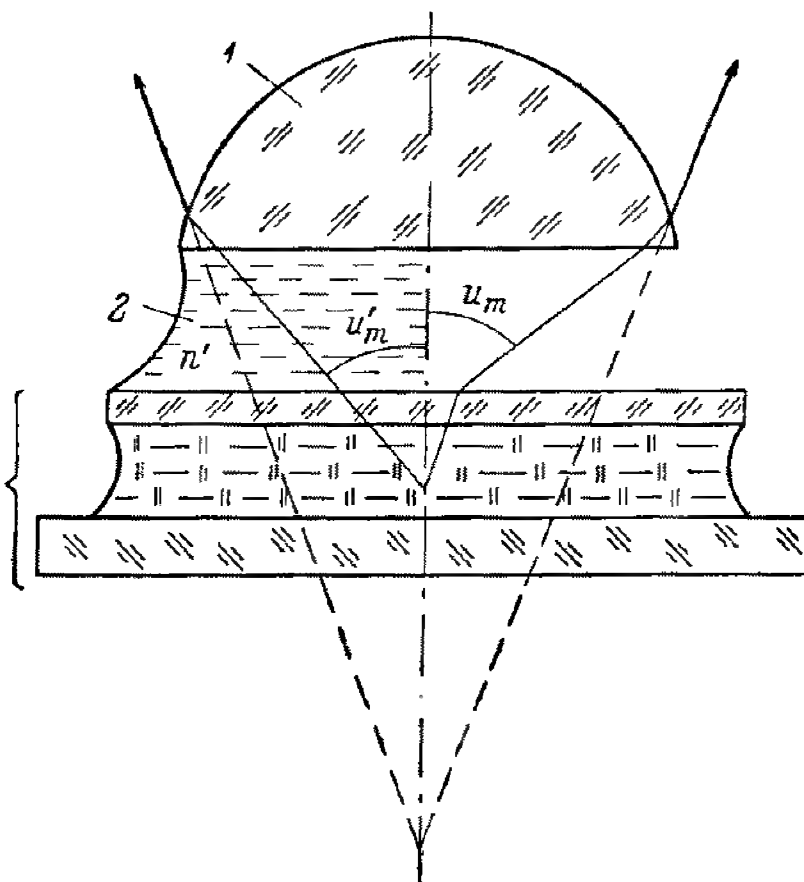


Рис. 21. К понятию о числовой апертуре.

$$A = n \sin u_m. \tag{59}$$

Среда, помещаемая между препаратом и объективом, называется *иммерсионной жидкостью*, или иммерсией, а объектив — *иммерсионным*. Из выражения (59) вытекает, что благодаря иммерсии можно повысить численную апертуру, а это, как будет показано в дальнейшем, имеет большое значение для микроскопии.

Численное значение апертуры объективов всегда гравируется на их оправах и указывается в справочниках.

В микроскопе (рис. 19) при вынутом окуляре *5* и правильно настроенном освещении можно наблюдать равномерно освещенный кружок, расположенный внутри объектива около его последней поверхности. Это — выходной зрачок *3* объектива *2*. Диаметр выходного зрачка объектива обычно равен 4—8 мм. Входной зрачок *3'* представляет собой изображение выходного зрачка через объектив и определяет апертурный угол u_m конуса лучей, выходящих из препарата *1* и вступающих в систему. Выходной зрачок *3''*

всего микроскопа представляет собой изображение выходного зрачка объектива, спроектированное окуляром *5*.

Так как выходной зрачок объектива расположен вблизи его задней фокальной плоскости, то его радиус с достаточной степенью точности будет равен

$$r_{\text{вых. об}} = \Delta \cdot \operatorname{tg} u'_m.$$

Из-за малости апертурного угла u'_m можно считать, что $\operatorname{tg} u'_m = \sin u'_m = A'$, и тогда

$$r_{\text{вых. об}} = \Delta \cdot A'. \qquad (60)$$

В дальнейшем будет показано, что $A = A'V_{\text{об}}$. Отсюда

$$r_{\text{вых. об}} = \frac{\Delta A}{V_{\text{об}}}, \qquad (61)$$

а применение формулы (54) приводит к выражению

$$r_{\text{вых. об}} = Af'_{\text{об}}. \qquad (62)$$

Ввиду того что выходной зрачок микроскопа *3''* является изображением выходного зрачка объектива, созданным окуляром, то, воспользовавшись формулами (38), (55), (56) и (61), можно определить радиус зрачка *3''*:

$$r = \frac{Ap}{\Gamma}. \qquad (63)$$

Чтобы представить себе реальные размеры выходного зрачка микроскопа и его положение, можно взять для примера объектив $V_{\text{об}} = 40^{\times}$, $A = 0.65$ и окуляр $\Gamma_{\text{ок}} = 15^{\times}$. Диаметр выходного зрачка микроскопа по формуле (63) равен $2r = \frac{2 \cdot 0.65 \cdot 250}{40 \cdot 15} = 0.54$ мм, а его удаление от последней поверхности окуляра составляет около 7 мм.

При наблюдении в микроскоп зрачок глаза σ совмещается с выходным зрачком прибора. Так как диаметр зрачка глаза около 2 мм, то в системе микроскоп—глаз он не ограничивает пучки лучей.

Полевая диафрагма микроскопа. Как уже говорилось, изображение предмета, образованное микроскопом, мнимое. Однако при наблюдении этого изображения глазом окончательное изображение на сетчатке — действительное. В следующем параграфе будет рассмотрен случай, когда микроскоп проектирует действительное изображение на фотопластинку. Как сетчатка глаза, так и фотопластинка имеют ограниченные размеры. Поэтому сопряженная с этой пластиной плоскость в пространстве предметов также ограничена, т. е. прибор имеет более или менее ограниченное поле зрения. Кроме того, возможности оптической системы также имеют предел. По этим причинам в плоскости промежуточного изображения *1'* (рис. 19) устанавливается диафрагма *4*, ограничивающая поле зрения прибора. Эта диафрагма называется *полевой диафрагмой*, или *люком*. Изображение полевой диафрагмы в пространстве предметов совпадает с препаратом и называется *входным люком* микроскопа, а в пространстве изображений — *выходным люком*.

Линейное поле зрения микроскопа определяется диаметром того круга в плоскости предмета, изображение которого заполняет диафрагму поля зрения окуляра, т. е. линейное поле зрения микроскопа равно

$$d_{\text{п}} = D_{\text{п}}/V_{\text{об}}, \qquad (64)$$

где $D_{\text{п}}$ — диаметр полевой диафрагмы.

В приведенном выше примере взяты объектив $V_{\text{об}} = 40^{\times}$ и окуляр $\Gamma_{\text{ок}} = 15^{\times}$. Этот окуляр имеет диафрагму, ограничивающую линейное поле

зрения в окуляре размером $D_п$=8 мм. Тогда линейное поле зрения микроскопа по формуле (64) будет $d_п$=8 : 40=0.2 мм.

Благодаря наличию полевой диафрагмы края изображения в микроскопе резко очерчены, а плоскость изображения равномерно освещена.

Особо следует остановиться на следующем свойстве взаимного расположения зрачков и люков, которое имеет большое практическое значение.

На входной зрачок опирается множество конусов лучей, вершина каждого из которых лежит в одной из точек препарата, ограниченного входным люком. Это значит, что световые потоки от всех точек препарата равномерно распределяются по зрачку и полностью смешиваются в нем. И наоборот, в каждой точке зрачка лежит вершина конуса лучей, опирающегося на люк. В пространстве изображений картина носит аналогичный характер. Указанное обстоятельство характеризует тот факт, что в зрачке совершенно отсутствует какое-либо подобие препарату. По мере перемещения от зрачка к плоскости изображения и люку постепенно начинает формироваться изображение, подобное препарату, и в плоскости люка оно становится наиболее резким, качественным и контрастным.

3. ПРОЕКЦИЯ ИЗОБРАЖЕНИЯ ПРИ МИКРОФОТОГРАФИРОВАНИИ

Для того чтобы сфотографировать препарат через микроскоп, необходимо получить на фотопластинке действительное увеличенное изображение препарата. Поэтому ход лучей в случае проекции изображения отличается от хода лучей в микроскопе при визуальном наблюдении.

В микрофотографии отношение размера изображения к размеру предмета называют *масштабом изображения*, или увеличением.

Проекция изображения микропрепарата может быть осуществлена несколькими способами.

1) Пластинку можно поместить вместо окуляра в плоскости промежуточного изображения, созданного объективом. Так как масштаб изображения здесь небольшой, то потребуется дальнейшее довольно значительное увеличение полученного негатива. Высококачественные фотографии можно получить, если увеличение при их печати не превышает ~10×. Это значит, что с объективом 100× масштаб изображения на фотоотпечатке будет не более 1000×. Величина не всегда достаточная. Значит, данный способ проекции малоэффективен. Однако в редких случаях он применяется.

2) Можно удалить окуляр и получить сильно увеличенное действительное изображение на большом расстоянии от объектива, который при этом надо перефокусировать. Масштаб изображения будет достаточен, но качество резко ухудшится, так как расстояние до изображения окажется значительно больше оптической длины тубуса и ход лучей в оптической системе не будет соответствовать расчетным условиям. Ясно, что этот способ не пригоден для работы с обычными микрообъективами.

Тем не менее такой метод проекции применяется для получения небольших увеличений (до 20×), но с использованием специально для этой цели рассчитанных объективов (микропланар, корректар и др.). Подобный метод называется *макрофотографией*. Применяется он довольно широко.

3) Наиболее приемлемый (с некоторыми оговорками, о которых сообщается ниже) и распространенный способ заключается в том, что если несколько перефокусировать микроскоп, то окуляр, действуя как проекционная система, создаст действительное увеличенное изображение на пластинке (рис. 22, *а*).

Объектив *2* устанавливается относительно препарата *1* так, что увеличенное, действительное и перевернутое изображение *1'* образуется в плоскости, находящейся перед фокусом $F_{ок}$ окуляра *4*, который в этом случае

может дать вторично увеличенное действительное и еще раз перевернутое изображение $1''$ препарата на фотопластинке *5*. Изображение $1''$ не перевернуто относительно препарата *1*.

Таким образом, при проекции объектив микроскопа работает почти так же, как и при визуальном наблюдении. Что касается окуляра, то он здесь работает как проекционная система.

Масштаб изображения на фотопластинке отличается от увеличения микроскопа, так как в этом случае увеличение окуляра, в отличие от визуального наблюдения, определяется по формуле

$$V_{\text{ок}} = -\frac{x'_0}{f'_{\text{ок}}}. \tag{65}$$

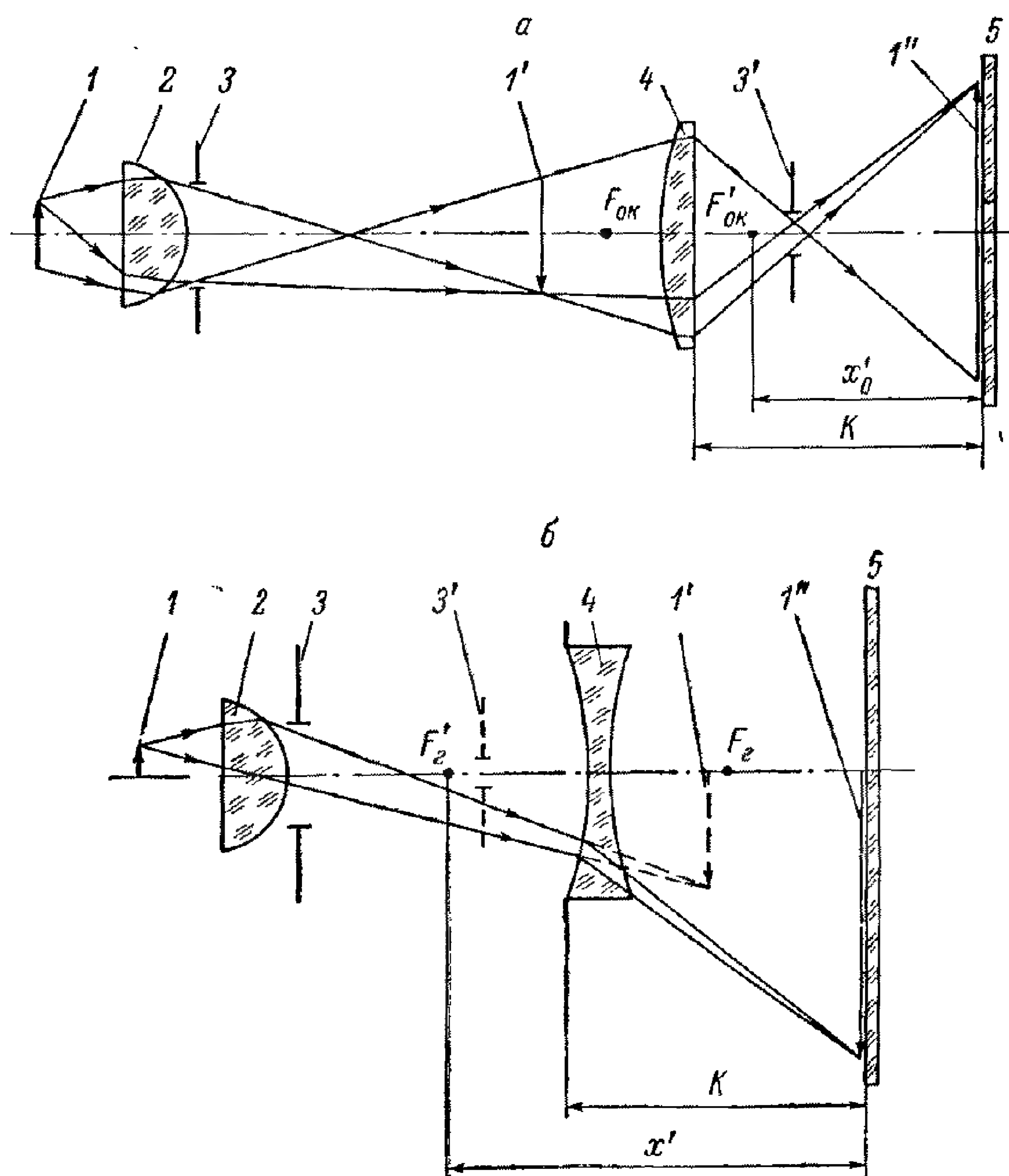


Рис. 22. Принципиальная схема микроскопа при микропроекции.

а — с положительным окуляром; *б* — с отрицательной системой вместо окуляра.

Так как расстояние x'_0 обычно значительно больше, чем $f'_{\text{ок}}$, то его можно заменить величиной K — расстоянием от окуляра до пластинки, которое называется *длиной камеры*. Тогда с учетом формулы (55) формулу (65) можно записать в виде

$$V_{\text{ок}} = \frac{K}{p} \cdot \Gamma_{\text{ок}}, \tag{66}$$

т. е. увеличение окуляра при проекции отличается от его увеличения при визуальном наблюдении множителем K/p.

Очевидно, что масштаб изображения на пластинке можно определить по формуле

$$\beta = V_{\text{об}} \Gamma_{\text{ок}} \frac{K}{p}. \tag{67}$$

В силу некоторых обстоятельств, которые ниже будут рассмотрены подробнее, иногда при микропроекции вместо положительного окуляра применяют отрицательную систему, называемую *гомалью*. В этом случае ход лучей в микроскопе будет отличаться от только что описанного (рис. 22, *б*). Здесь отсутствует действительное промежуточное изображение, создаваемое объективом в обычном микроскопе. Изображение *1'* предмета *1*, образуемое объективом *2*, является мнимым предметом для гомали *4*, расположенным между гомалью и ее передним фокусом $F_г$. Гомаль проектирует прямое увеличенное и действительное изображение *1''* на пластинку *5*. В результате изображение на пластинке перевернуто относительно предмета. Изображение выходного зрачка объектива *3* через гомаль, т. е. выходной зрачок всей системы *3'*, мнимое и расположено между гомалью и ее задним фокусом $F'_г$. Так как выходной зрачок находится внутри сис-

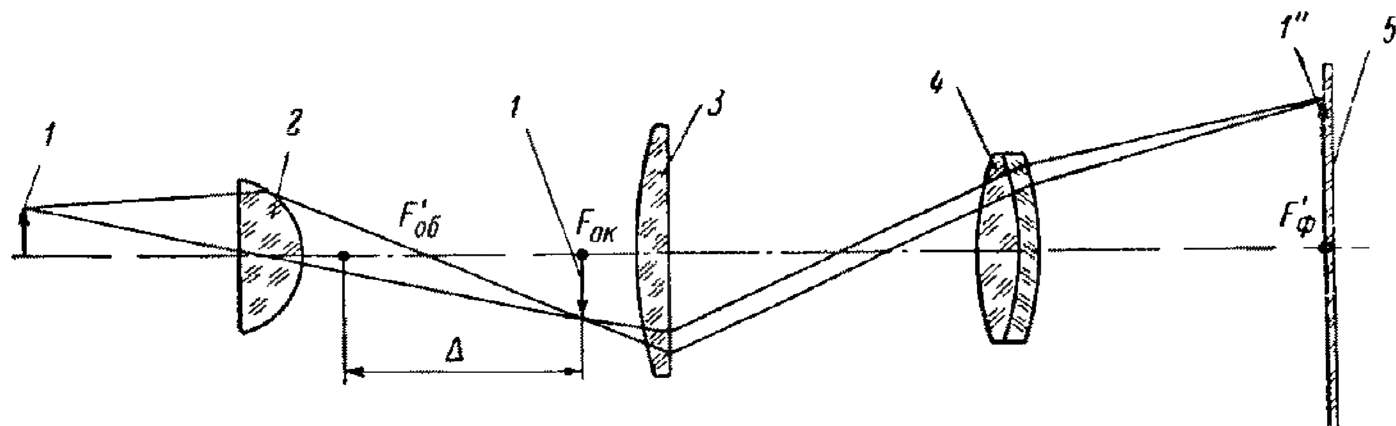


Рис. 23. Принципиальная оптическая схема соединения микроскопа с фотокамерой.

темы, то зрачок глаза не может быть совмещен с ним, и поэтому такая система не применяется для визуального наблюдения.

Масштаб изображения для микроскопа, в котором вместо окуляра применена гомаль, определяется формулой

$$\beta = V_{об} \frac{x'}{f'_г}. \tag{68}$$

Так же как и в случае окуляра, x' можно заменить расстоянием K от опорной плоскости гомали до пластинки. Тогда масштаб изображения будет

$$\beta = V_{об} \frac{K}{f'_г}. \tag{69}$$

Эта формула с достаточной степенью точности верна для сильных гомалей, фокусное расстояние которых не превышает 40 мм.

4) Иногда для проекции изображения микрообъекта применяется способ, поясненный рис. 23. Здесь микроскоп настроен как обычно, т. е. объектив *2* создает промежуточное изображение препарата *1* в фокальной плоскости окуляра *3*, который образует второе промежуточное изображение в бесконечности. Фотообъектив *4* камеры, помещенной за микроскопом, проектирует окончательное изображение препарата на пластинку *5*, находящуюся в фокальной плоскости объектива. Следовательно, при данном способе проекции оба прибора, микроскоп и фотокамера, работают в условиях, соответствующих расчету. Рассмотрев ход лучей в такой комбинированной системе, можно найти, что масштаб изображения равен

$$\beta = \frac{\Delta}{f'_{об}} \cdot \frac{f'_ф}{f'_{ок}}, \tag{70}$$

где Δ — оптическая длина тубуса; $f'_{об}$, $f'_ф$, $f'_{ок}$ — фокусные расстояния соответственно объектива микроскопа, фотообъектива и окуляра. Если сделать

подстановку, прибегнув к формулам (54) и (55), то это выражение примет вид

$$\beta = V_{\text{об}} \Gamma_{\text{ок}} \frac{f'_{\text{ф}}}{p}. \tag{71}$$

Его сравнение с формулой (68) показывает, что фокусное расстояние фотообъектива $f'_{\text{ф}}$ выполняет здесь роль длины камеры K.

Этот способ проекции не позволяет получить большого масштаба изображения, так как фокусное расстояние распространенных фотообъективов не превышает 100 мм, а обычно даже меньше.

4. ГЛУБИНА РЕЗКОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ

При рассматривании микрофотографии на ней видно резкое изображение не только тех деталей препарата, которые находились в плоскости, сопряженной с фотопластинкой. Резкими видны также изображения деталей, удаленных на некоторое расстояние от плоскости фокусировки. Это расстояние называют *глубиной резкого изображения*. Она представляет сумму двух величин: волновой глубины и геометрической глубины.

Согласно волновой теории, изображение точки представляет пространственную фигуру, протяженность которой вдоль оптической оси

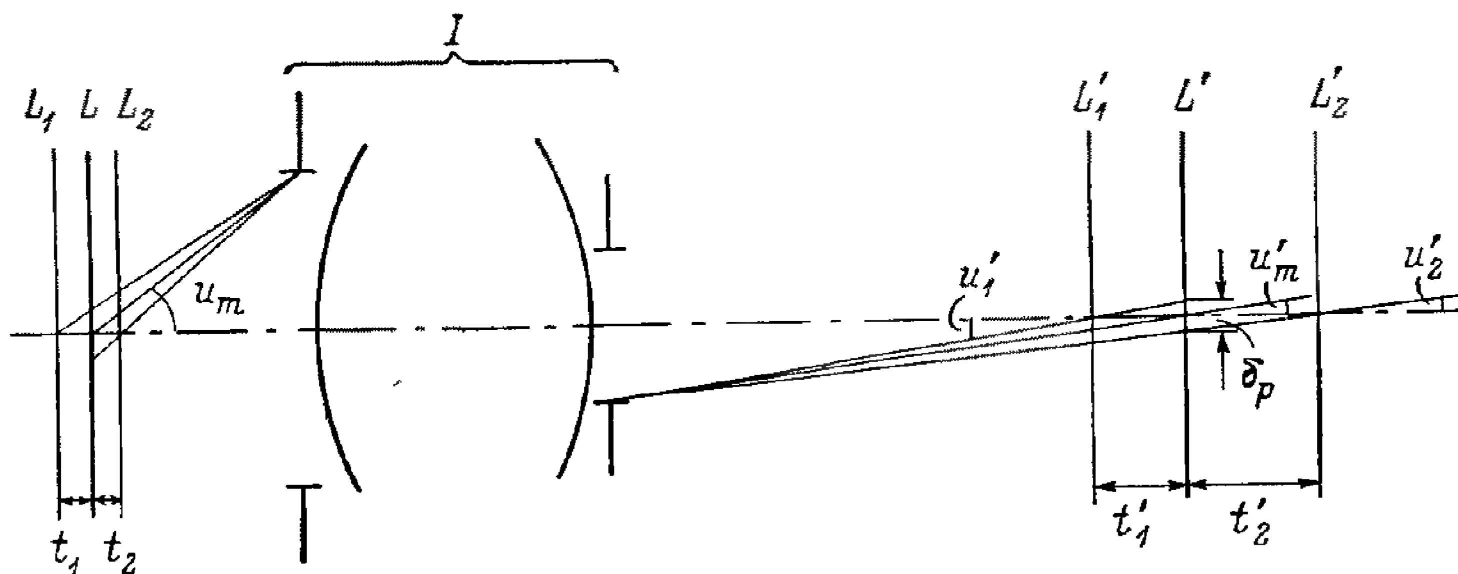


Рис. 24. К объяснению глубины резкого изображения.

определяется формулой (43). Путем расчетов и измерений установлено, что волновая глубина резкого изображения составляет восьмую часть всей фигуры и поэтому в пространстве предметов равна

$$T_{\text{В}} = \frac{\lambda}{2A^2}. \tag{72}$$

Геометрическую глубину резкого изображения можно найти, пользуясь рис. 24, где микроскоп I предствлен первой и последней преломляющими поверхностями, а также входным и выходным зрачками. Если плоскость L' совмещена с фотопластинкой, то на ней будут резко изображаться точки предметной плоскости L. Точки плоскостей L_1 и L_2 будут спроектированы на пластинку не в виде точек, а в виде так называемых *кружков рассеяния*, размер которых зависит от расстояния между плоскостями и от апертурного угла. На фотографии глаз не заметит размытия изображения, если кружок рассеяния не превышает остроты зрения, т. е. его допустимый диаметр при наблюдении с расстояния наилучшего видения равен

$$\delta_{\text{р}} = p\varepsilon. \tag{73}$$

Так как $\delta_{\text{р}}$ — величина маленькая, то расстояния t'_1 и t'_2 малы по сравнению с расстоянием от микроскопа до фотопластинки. Поэтому

с некоторым приближением можно считать, что углы u_1', u_m' и u_2' равны друг другу. Кроме того, выходная апертура в микроскопе также мала. Тогда с достаточной степенью точности

$$t_1' = t_2' = \frac{\delta_p}{2 \sin u_m'} = \frac{\delta_p}{2A'} \,. \tag{74}$$

Отсюда, пользуясь формулами (36) и (73) и соотношением $A = \beta A'$, можно найти выражение для геометрической глубины резкого изображения:

$$T_г = t_1 + t_2 = \frac{t_1' + t_2'}{\beta^2} = \frac{\delta_p \beta}{\beta^2 A} = \frac{\delta_p}{\beta A} = \frac{p\varepsilon}{\beta A} \,. \tag{75}$$

Приняв остроту зрения $\varepsilon = 2'$, последнюю формулу часто записывают в виде

$$T_г = \frac{1}{7\beta A} \text{ мм}. \tag{76}$$

Общая глубина резкого изображения равна

$$T = T_г + T_В = \left(\frac{1000}{7AV} + \frac{\lambda}{2A^2}\right) \text{ мкм}. \tag{77}$$

Надо сказать, что приближения, допущенные при выводе формулы (75), приводят к ошибке в несколько десятков процентов в случае малых увеличений при больших апертурах. Более правильный результат можно получить, введя в формулу множитель $\cos u_m$. Указанные случаи встречаются довольно редко, когда пользуются микроскопом с необычно большой апертурой при данном увеличении.

Если масштаб изображения равен верхнему полезному пределу $\beta = 1000\,A$ (об этом см. ниже), а длина волны составляет $\lambda = 0.515$ мкм, то формула (77) упрощается:

$$T = \frac{0.4}{A^2} \,. \tag{77'}$$

Этим выражением часто пользуются на практике.

Не следует думать, что на границе глубины резкого изображения происходит скачок от резкого к нерезкому изображению. Резкость теряется постепенно, и поэтому границы глубины изображения довольно условны.

5. РАЗРЕШАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ И ПОЛЕЗНОЕ УВЕЛИЧЕНИЕ

Разрешающая способность микроскопа, т. е. способность давать раздельные изображения двух соседних элементов самосветящегося объекта, ограничена явлениями дифракции света и, согласно формуле (44), зависит только от апертуры объектива и длины волны света:

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{A} \,. \tag{78}$$

Обычно через микроскоп наблюдают несамосветящиеся объекты. Теория, разработанная для этого случая Аббе, дает следующее представление об образовании изображения и о связи разрешающей способности с апертурой объектива и длиной волны света. Теория была развита для идеального объекта, представляющего собой контрастную решетку, состоящую из многих чередующихся прозрачных и непрозрачных штрихов.

При прохождении параллельного пучка лучей S через решетку G возникает дифракция Фраунгофера (рис. 25). В задней фокальной плоскости F' объектива *Об*, с которой практически совпадает и выходной зрачок объектива, получается спектр нулевого порядка 0, созданный прямо прошедшими лучами (сплошные линии). Спектральный максимум первого порядка *+1* образуется лучами, дифрагированными под углом ψ (штриховые линии), для которого в соответствии с рисунком выполняется условие

$$d = \frac{\lambda}{\sin i + \sin (\psi - i)}, \tag{79}$$

где d — интервал между соседними темными или светлыми штрихами решетки. Такой же спектр минус первого порядка, лучи которого не

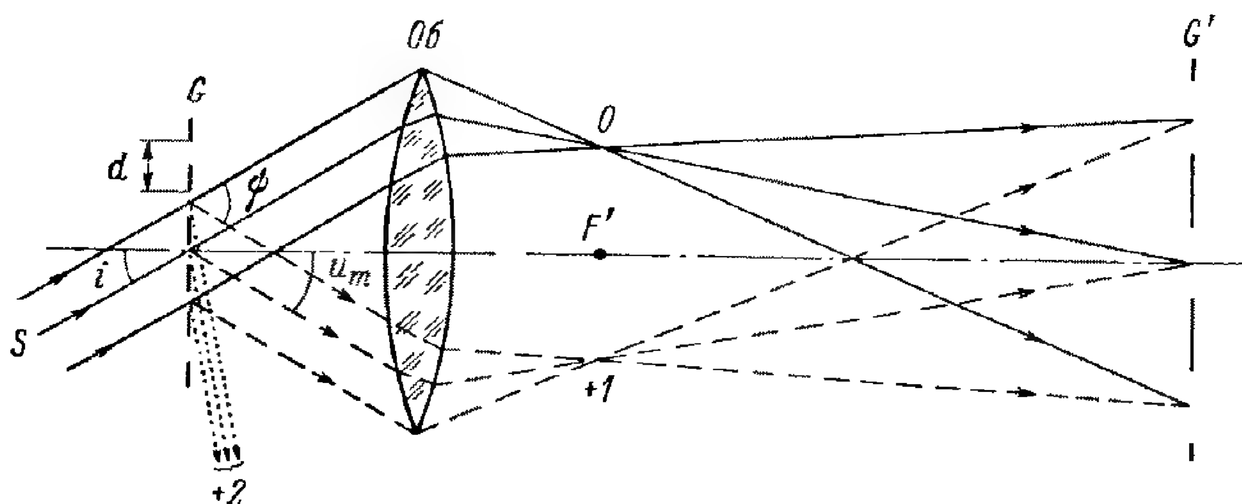


Рис. 25. Образование изображения в микроскопе по теории Аббе.

показаны на рисунке, образуется по другую сторону от нулевого максимума.

Отверстие объектива, представленного на рисунке, таково, что лучи спектров второго (пунктир) и более высоких порядков уже не попадают в объектив.

При дальнейшем распространении лучи от всех спектральных максимумов, имеющихся в выходном зрачке объектива, интерферируют между собой, образуя изображение решетки G'. Аббе показал, что для возникновения изображения, подобного объекту, необходимо, чтобы в выходном зрачке объектива имелось не менее двух соседних максимумов. Для этого в свою очередь необходимо, чтобы лучи, дифрагированные под углом ψ, могли вступить в объектив, т. е. чтобы апертурный угол u_m был не меньше угла $\psi - i$. Тогда, при замене в формуле (79) $\sin \psi - i$ на апертуру объектива A, а $\sin i$ на апертуру освещающего пучка A_0 оказывается, что разрешаемое расстояние d для решетки равно $d = \lambda/(A + A_0)$.

Эта формула справедлива лишь в том случае, когда выходной зрачок объектива имеет прямоугольную форму. Для круглого зрачка разрешаемое расстояние несколько больше и равно

$$\delta = d = 1.22\lambda/(A + A_0). \tag{80}$$

Из этой формулы следует, что для повышения разрешающей способности препарат необходимо освещать сходящимся пучком лучей. В предельном случае, когда $A = A_0$, формула принимает вид

$$\delta = \frac{0.61\lambda}{A}. \tag{81}$$

Если препарат имеет достаточно мелкую периодическую структуру (таковы, например, диатомеи — кремневые панцири водорослей), то в

выходном зрачке объектива можно наблюдать картину дифракционных спектров, аналогичную приведенной на рис. 26.

Надо отметить, что разрешающая способность микроскопа зависит от способа освещения препарата и от контраста последнего. Поэтому, как правило, реальная разрешающая способность несколько хуже, нежели определенная по формуле (81).

Так как разрешающая способность микроскопа ограничена, то увеличение микроскопа также ограничено некоторым пределом, который носит название *полезного увеличения*. Принимая во внимание остроту зрения (46), можно найти, что на расстоянии наилучшего видения глаз может разрешать детали, находящиеся на расстоянии $p\varepsilon = 0.15 \div 0.30$ мм. Полезное увеличение микроскопа Γ должно быть таким, чтобы разрешаемое им расстояние δ также имело видимую величину 0.15—0.30 мм, т. е.

$$\Gamma\delta = (0.15 \div 0.30) \text{ мм}.$$

Подстановка формулы (81) дает

$$\Gamma\delta = \frac{0.61\lambda}{A}\Gamma = 0.15 \div 0.30 \text{ мм}.$$

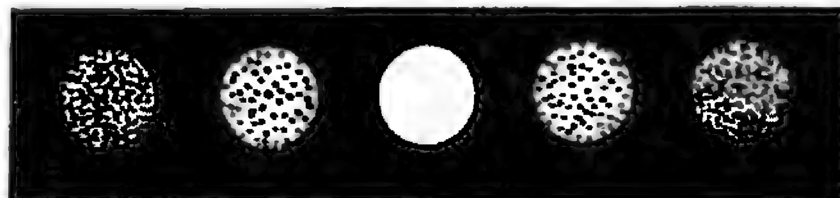


Рис. 26. Дифракционные максимумы в выходном зрачке объектива.

Отсюда при средней длине волны видимого света $\lambda = 0.0005$ мм полезное увеличение микроскопа приближенно равно

$$\Gamma = (500 \div 1000)\, A. \tag{82}$$

Увеличение меньше 500 A не даст возможности увидеть все тонкости структуры препарата, так как разрешающая способность глаза в этом случае меньше, чем у микроскопа. В пределах полезного увеличения разрешающая способность микроскопа полностью реализуется. Поэтому при увеличениях больше 1000 A нельзя выявить никаких новых подробностей в изображении. Качество же изображения при дальнейшем повышении увеличения будет ухудшаться из-за явлений, связанных со слишком малыми размерами выходного зрачка микроскопа. Однако увеличение больше 1000 A применяют при наблюдении очень мелких структур в течение длительного времени.

Несколько иная картина имеет место в микрофотографии. Здесь очень часто стремятся получить масштаб изображения больше 1000 A. Малые размеры выходного зрачка при фотографировании ограничивают лишь освещенность изображения. В то же время глазу предоставляется возможность без большого напряжения рассматривать на фотографии изображения очень мелких структур.

6. ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА И МЕТОДЫ ОСВЕЩЕНИЯ

Препараты, наблюдаемые через микроскоп, в большинстве случаев несамосветящиеся, и поэтому для того, чтобы иметь возможность их видеть, они должны быть освещены от постороннего источника. Выше было указано, что разрешающая способность микроскопа зависит не только от апертуры объектива, но и от апертуры осветительной системы. Кроме того, от условий освещения препарата зависит степень подобия между ним и его изображением. Большое значение, особенно в микрофотографии, имеет равномерность освещения поля зрения. В то же время бóльшая часть применяемых в микроскопии источников света имеет неравномерно светящееся тело накала небольших размеров (например, спираль

лампы накаливания). Все перечисленное учитывается в *методе освещения по Кёлеру*, который описан ниже.

Прозрачный препарат освещают проходящим через него светом (рис. 27). Элемент *6*, называемый *конденсором*, предназначен для получения такого большого изображения источника света, которое смогло бы заполнить световым потоком всю апертуру объектива. Этого можно достигнуть, если поместить предварительное изображение источника в плоскости, близкой к фокальной плоскости конденсора, где находится его входной зрачок. В этой плоскости установлена *ирисовая апертурная диафрагма 5*, с помощью которой изменяют размер осветительной апертуры. Изображение апертурной диафрагмы и источника конденсором и объективом *8* проектируется в плоскость выходного зрачка *9* этого объектива.

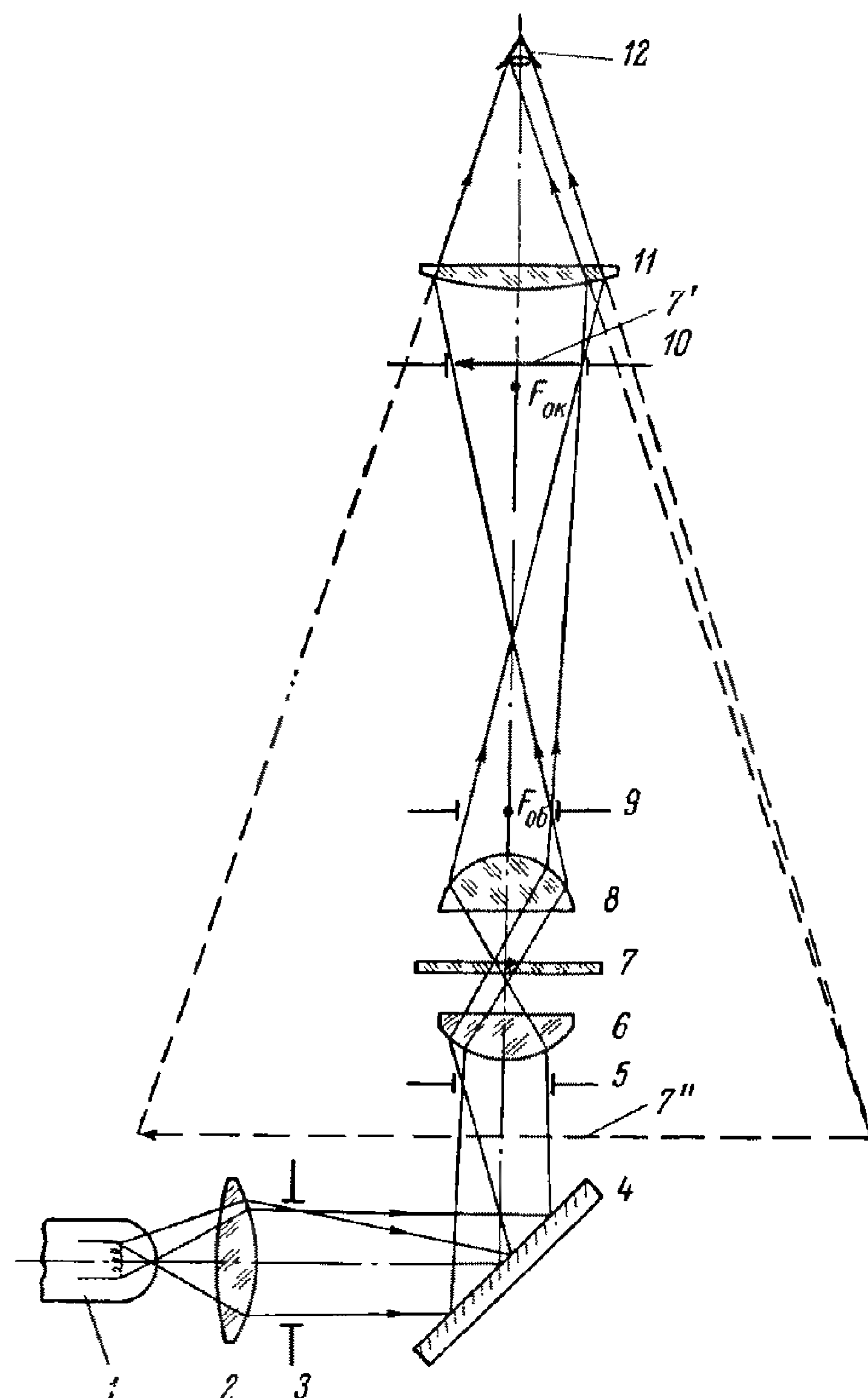


Рис. 27. Принципиальная схема микроскопа и осветительной системы.

1 — источник света; *2* — коллектор; *3* — ирисовая полевая диафрагма; *4* — зеркало; *5* — ирисовая апертурная диафрагма; *6* — конденсор; *7* — препарат; *8* — объектив; *9* — выходной зрачок объектива; *10* — полевая диафрагма окуляра; *11* — окуляр; *12* — глаз.

Изображение источника света *1* в плоскости апертурной диафрагмы образуется линзой *2*, называемой *коллектором*. Источник света и коллектор, образующие вместе осветитель, располагаются, как правило, в стороне от микроскопа, поэтому в ход лучей вводится дополнительное плоское зеркало *4*.

Если посмотреть на коллектор со стороны конденсора, то отверстие коллектора выглядит как яркий равномерно освещенный круг. Поэтому конденсор устанавливается так, чтобы он проектировал в плоскость препарата *7* отверстие коллектора или, точнее, расположенную в непосредственной близости к коллектору *ирисовую* диафрагму *3*, называемую *полевой диафрагмой*. Таким образом, эта диафрагма оказывается сопряженной с люком микроскопа, а источник света — с его зрачком. Если вспомнить особенность взаимодействия зрачка и люка, то становится ясно, что описанная система позволяет получить равномерное освещение поля зрения от источника, светящееся тело которого имеет неодинаковую яркость по площади (например, спираль лампы накаливания).

Кроме того, необходимо устранить в системе излишний свет, который не участвует в освещении препарата и в образовании его изображения, потому что такой бесполезный свет приводит к уменьшению контраста изображения за счет аберраций системы, рассеяния и вредных рефлексов. Так как одна и та же осветительная система (т. е. конденсор и осветитель)

применяется с различными объективами и окулярами, то для устранения бесполезного света необходимо при смене объектива или окуляра апертурную диафрагму, изображение которой при вынутом окуляре видно в плоскости выходного зрачка объектива, открыть так, чтобы ее видимый диаметр был равен диаметру (чаще несколько меньше) зрачка; полевую диафрагму осветителя, края которой видны в поле зрения окуляра, открыть лишь настолько, чтобы диаметр ее изображения был равен диаметру поля зрения, ограниченного диафрагмой окуляра.

Довольно редко, но все же применяются в микроскопии для освещения наблюдаемого предмета источники с равномерно светящимся телом накала (например, ленточные лампы). В этом случае источник может быть спроектирован непосредственно в поле зрения микроскопа. Такой способ освещения называется *критическим*. Оптическая система, проектирующая источник, и здесь рассчитывается так, чтобы осветительные пучки заполнили весь зрачок объектива.

Описанный метод освещения препарата называется *методом светлого поля*. Он применяется при наблюдении контрастных препаратов, у которых элементы структуры имеют различную абсорбцию. В этом случае пучок лучей из конденсора заполняет бóльшую часть апертуры объектива и в отсутствие препарата равномерно освещает поле зрения. Поглощающие элементы структуры выглядят темными на светлом фоне. Метод может быть полезен и при рассматривании непоглощающих объектов в том случае, когда элементы их структуры отклоняют или рассеивают свет настолько сильно, что значительная часть освещающего пучка не попадает в объектив.

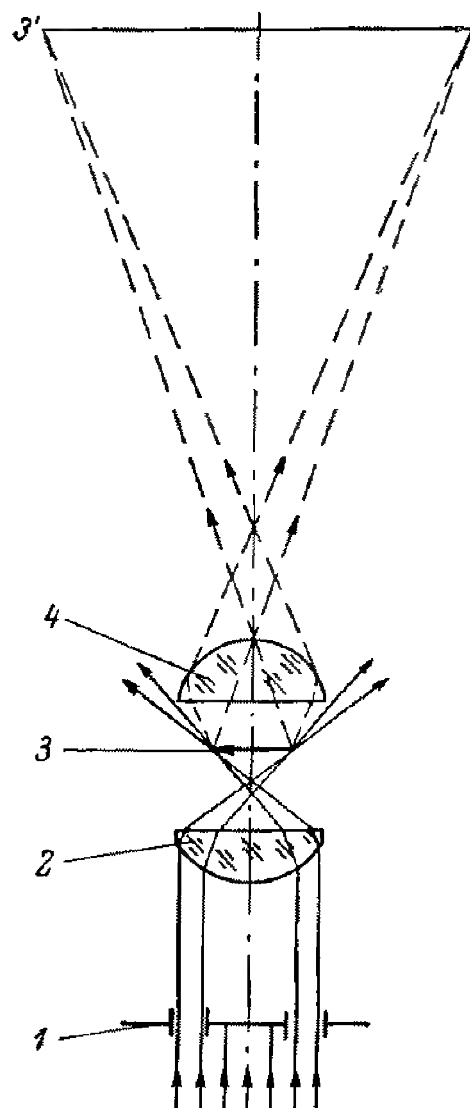


Рис. 28. Принципиальная схема освещения по методу темного поля в проходящем свете.

Метод одностороннего косого освещения отличается от предыдущего тем, что при нем ось освещающего пучка расположена под углом по отношению к оптической оси микроскопа. Такое освещение подчеркивает контуры объектов определенной формы за счет образования теней и придает им кажущуюся рельефность. Метод бывает полезен при наблюдении объектов с недостаточной контрастностью. Косое освещение достигается за счет смещения апертурной диафрагмы конденсора относительно оптической оси микроскопа. Эксцентричное положение диафрагмы можно наблюдать в выходном зрачке объектива при вынутом окуляре.

Если сместить апертурную диафрагму еще дальше от оси настолько, чтобы свет, направленный конденсором на препарат, совершенно не попадал в объектив, то метод косого освещения превращается в *метод темного поля*. Этот метод применяется для получения изображений очень малых объектов или непоглощающих прозрачных объектов, не видимых в светлом поле.

Схема освещения по методу темного поля представлена на рис. 28. Здесь центральная часть апертурной диафрагмы *1* закрыта непрозрачным диском, так что пучок лучей выходит из конденсора *2* в виде полого конуса и непосредственно в объектив *4* не попадает. Изображение *3'* объекта *3* создается только рассеянными (дифрагированными) лучами (обозначены штриховыми линиями). Рассеяние света происходит вследствие того, что элементы структуры отличаются от окружающей среды по показателю преломления. В поле зрения микроскопа на темном фоне получаются

светлые изображения мелких деталей. У крупных деталей видны только светлые контуры. Следует отметить, что при этом методе освещения по виду изображения нельзя определить, прозрачны частицы или непро-

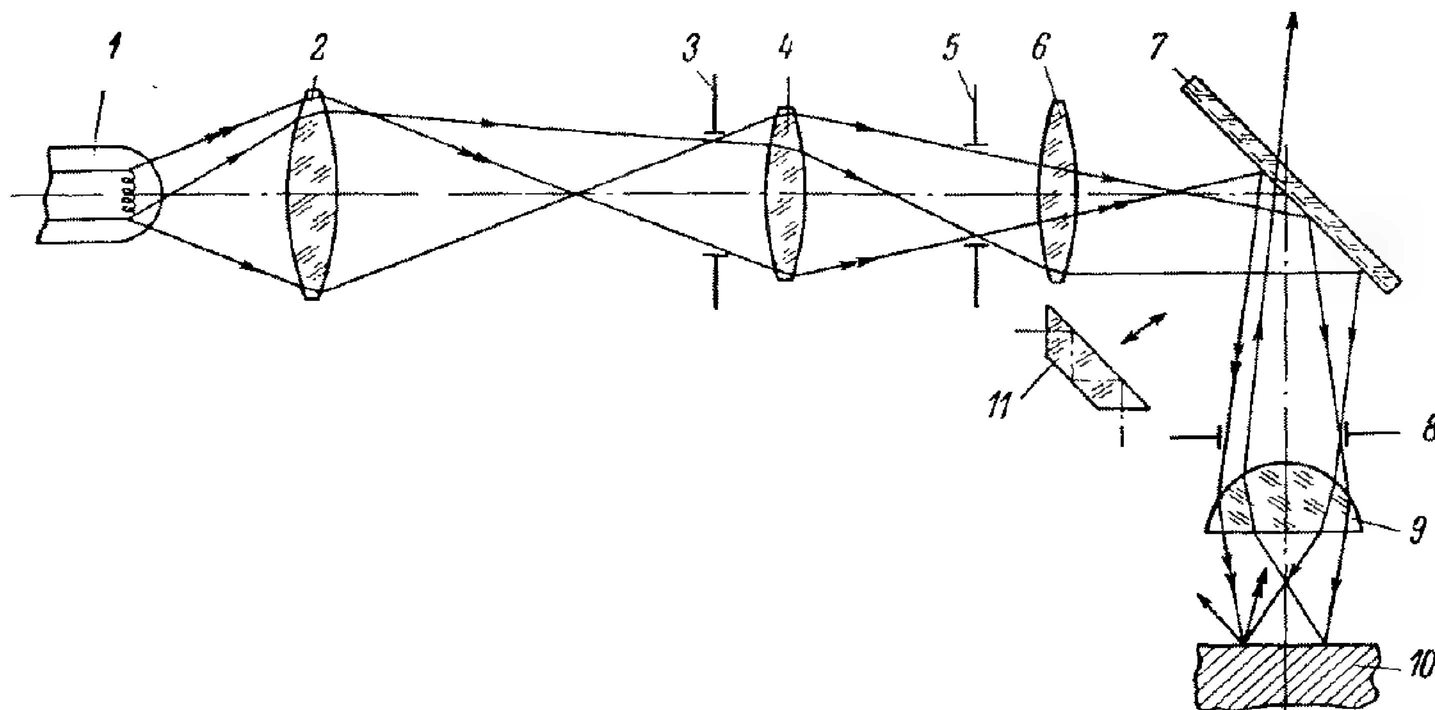


Рис. 29. Принципиальная схема опак-иллюминатора.

зрачны, больший или меньший показатель преломления они имеют по сравнению с окружающей средой.

Чтобы прямой свет не мог попасть в объективы больших апертур, средняя темная часть полого конуса лучей должна иметь большой угол раскрытия. Поэтому при методе темного поля между фронтальной линзой конденсора и предметным стеклом необходимо вводить иммерсионную жидкость.

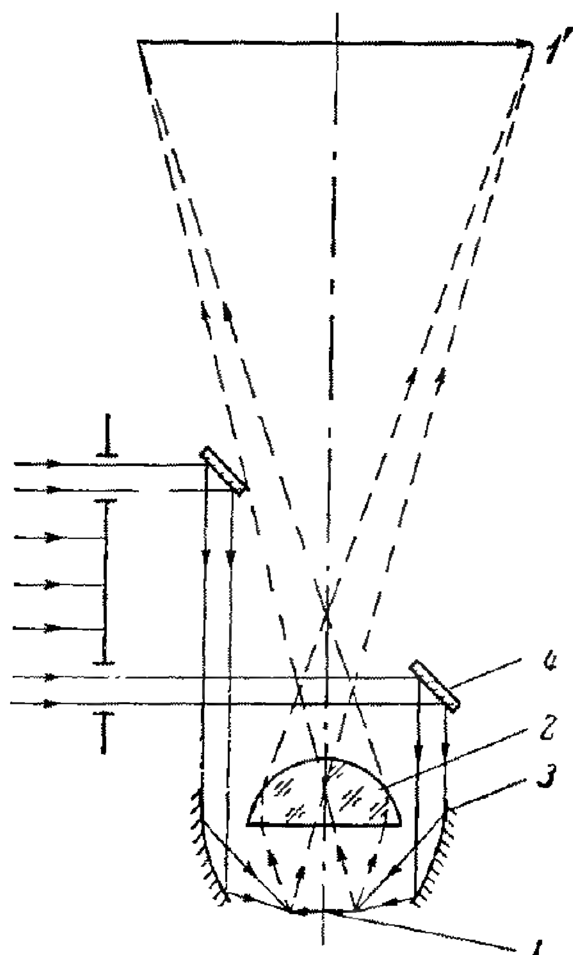


Рис. 30. Принципиальная схема освещения по методу темного поля в отраженном свете.

Непрозрачный препарат при наблюдении его в микроскоп освещают с помощью устройства, называемого *опак-иллюминатором* (рис. 29), падающим светом через объектив микроскопа, который в этом случае выполняет одновременно и роль конденсора. *Метод светлого поля* осуществляется следующим образом.

Источник света *1* проектируется коллектором *2* в плоскость ирисовой апертурной диафрагмы *3*, которая линзой *6* изображается в плоскости выходного зрачка *8* объектива *9*. Отверстие коллектора *2* проектируется линзой *4* в плоскость ирисовой полевой диафрагмы *5*, а затем линзой *6* и объективом *9* — в поле зрения микроскопа на препарат *10*. Пластинка *7*, называемая *пластинкой Бека*, имеет полупрозрачное покрытие и выполняет роль зеркала: при освещении часть светового пучка она направляет в объектив, а часть проходит через нее и теряется; при наблюдении часть пучка из объектива проходит через пластинку к окуляру, а часть отражается пластинкой и в работе не участвует. На рисунке показан ход лучей только в осветительной системе. Ход лучей в самом микроскопе остается таким же, как и при наблюдении прозрачных препаратов.

В отличие от освещения проходящим светом косое освещение непрозрачных объектов осуществляется двумя способами: а) смещением апертурной диафрагмы с оптической оси; б) включением вместо пластинки Бека призмы *11*, называемой *призмой Наше*.

Метод темного поля в отраженном свете (рис. 30) осуществляется путем освещения объекта *1* сверху с помощью специальной кольцевой зеркальной системы *3—4*, расположенной вокруг объектива *2*. *Эпиконденсор 3* обычно имеет асферическую поверхность. Так же как и при проходящем свете, изображение здесь создается только лучами, рассеяными объектом (штриховые линии), тогда как лучи света, вышедшие из эпиконденсора и зеркально отразившиеся от поверхности объекта (сплошные линии), в объектив не попадают.

7. МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ОПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Микроскопы обычного типа, о которых до сих пор шла речь, позволяют исследовать, как правило, объекты, имеющие различную степень абсорбции света в разных участках. Многие объекты обладают иными физическими свойствами. Основываясь на них, можно расширить круг исследований и тем самым увеличить объем получаемой информации. Осуществление этого требует введения в микроскоп дополнительных оптических средств.

Метод исследования в поляризованном свете

Метод исследования в поляризованном свете применяется для изучения *анизотропных* объектов, т. е. объектов, у которых оптические свойства неодинаковы по различным направлениям. Анизотропия может

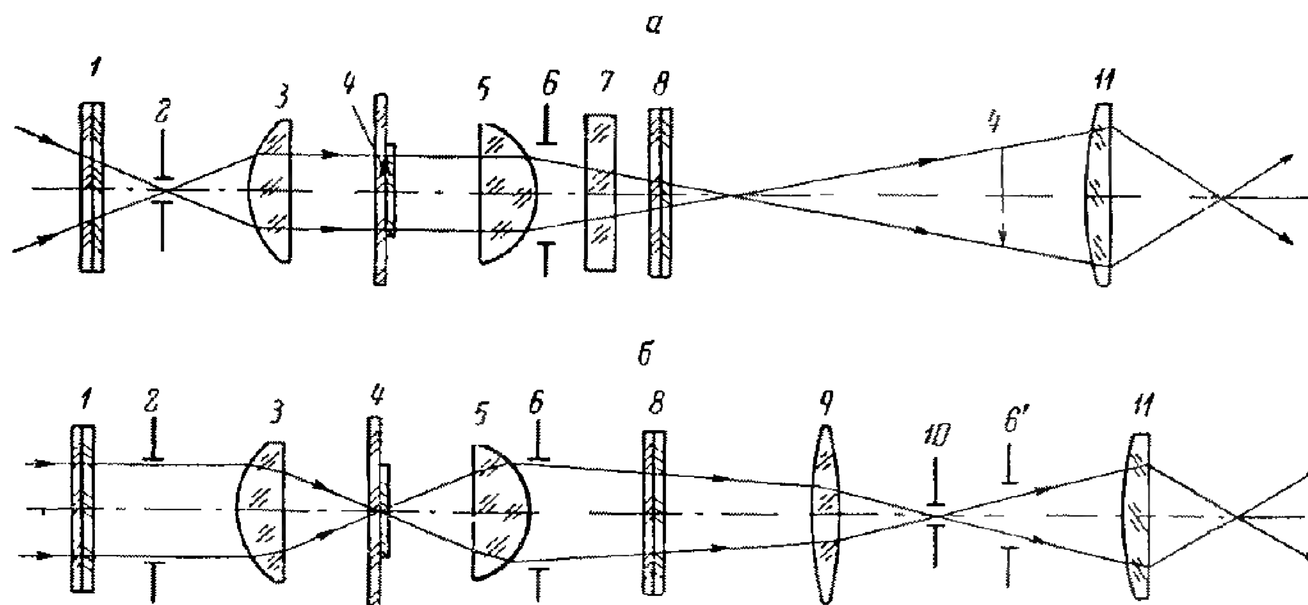


Рис. 31. Принципиальная оптическая схема поляризационного микроскопа.

а — для ортоскопического наблюдения; *б* — для коноскопического наблюдения.

быть естественной и искусственной. Знание анизтропии препарата позволяет судить о его структуре и физико-химических свойствах.

Исследование анизотропии производится на поляризационном микроскопе. Во многих случаях наблюдаются явления интерференции поляризованных лучей, которые изучаются двумя способами. Первый способ называют *ортоскопическим* наблюдением, второй — *коноскопическим* (рис. 31).

Получение линейно-поляризованного света осуществляется с помощью поляризатора *1* (рис. 31,*а*). Анизотропный препарат *4* в силу своей при-

роды может внести какие-то изменения в структуру поляризованного света. Исследования этих изменений производятся с помощью компенсатора *7* и анализатора *8*, представляющего собой поляризующий элемент обычного типа.

При ортоскопическом ходе лучей в фокальную плоскость окуляра *11* проектируется изображение препарата. Наблюдаемая при этом интерференция поляризованных лучей локализована в плоскости препарата. Для получения качественной картины необходимо освещать препарат параллельным пучком света. Такое освещение достигается путем уменьшения диаметра апертурной диафрагмы *2* конденсора *3*. Это исключает наклонные лучи, которые могут исказить результаты исследования.

При коноскопическом ходе (рис. 31,*б*) лучей апертурная диафрагма открывается и препарат освещается сильно сходящимися пучками лучей. Интерференция поляризованных лучей при этом локализована в бесконечности и интерференционная картина возникает в задней фокальной плоскости объектива *5*. Наблюдение интерференционной картины производится с помощью линзы Бертрана *9*, которая проектирует выходной зрачок *6* в фокальную плоскость окуляра. Диафрагма *10* ограничивает определенный участок изображения препарата и тем самым локализует объект исследования.

С помощью поворотного анализатора и компенсаторов различных типов производятся измерения величины двойного лучепреломления, углов поворота плоскости поляризации, определение углов погасания и других характеристик.

Интерференционные фигуры, наблюдаемые при коноскопировании, дают возможность определить: одно- или двуосный объект, знак двойного лучепреломления (т. е. оптический знак кристалла), какова ориентация объекта и величина угла между оптическими осями. Кроме того, эти фигуры позволяют диагностировать изучаемые препараты и элементы их структуры.

Изучение дисперсии всех видов оптической анизотропии и плеохроизма может производиться только с применением средств, обеспечивающих выделение отдельных спектральных диапазонов.

Метод фазового контраста

В практике часто встречаются бесцветные и прозрачные препараты, почти невидимые при обычных методах исследования. Отдельные участки таких препаратов отличаются от окружающей среды по показателю преломления. Вследствие этого проходящий через них свет смещается по фазе на величину

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda}(n_0 - n_c)\, d, \qquad (83)$$

где n_0 и n_c — показатели преломления соответственно объекта и среды; d — толщина объекта; λ — длина волны света.

Таким образом, световая волна, прошедшая сквозь препарат, претерпевает различные изменения по фазе и приобретает так называемый «*фазовый*» рельеф, который не способны воспринять ни глаз, ни фотопластинка, чувствительные только к изменению интенсивности света. Интенсивность в свою очередь определяется амплитудой колебаний.

Метод фазового контраста дает возможность преобразовать фазовые изменения в амплитудные и, следовательно, заменить фазовый рельеф амплитудным. В результате получается видимое фазовоконтрастное изображение препарата, в котором распределение освещенностей до некоторой степени соответствует распределению фаз.

Можно представить объект в виде непоглощающей прозрачной «фазовой» решетки, состоящей из большого числа мелких чередующихся выступов и впадин. Анализ дифракционных максимумов в задней фокальной плоскости объектива при освещении такой решетки параллельным пучком света показывает, что:

а) если принять освещенность нулевого максимума за 100, то в первом максимуме она равна 2.9, а во втором — 0.322;

б) волны, выходящие из нулевого максимума, сдвинуты по фазе относительно волн, выходящих из других максимумов, на 90° (при объекте, вносящем малую разность фаз).

Метод фазового контраста, предложенный Цернике, основан на искусственном изменении фазы и амплитуды волн, выходящих из одного или нескольких максимумов. Это можно представить с помощью диаграммы на рис. 32.

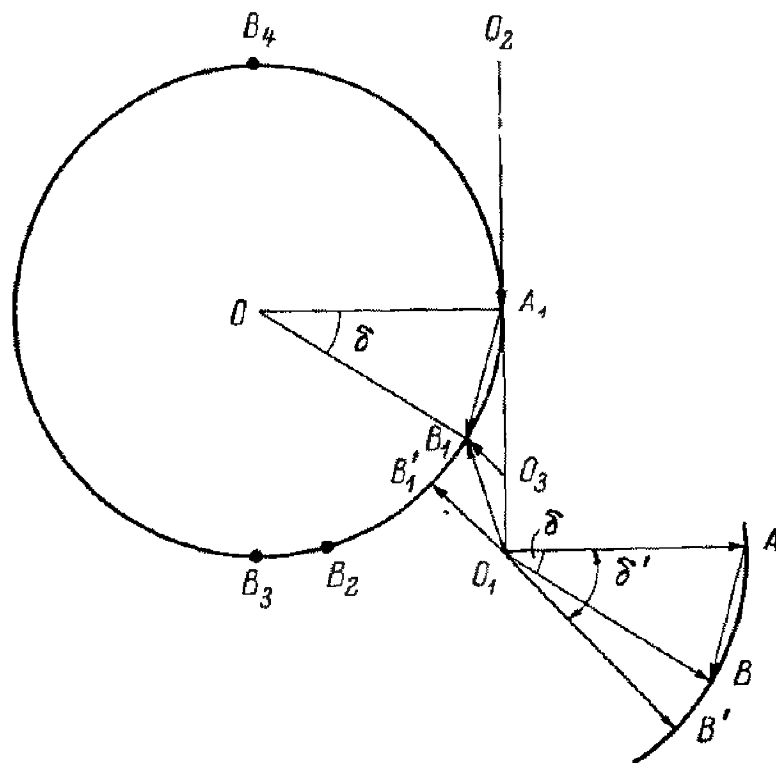


Рис. 32. Векторная диаграмма к объяснению метода фазового контраста.

Вектор $\overline{O_1A}$ обозначает световую волну, падающую на препарат. Длина вектора пропорциональна амплитуде, квадрат которой определяет интенсивность света. Эта волна присутствует всегда вне зависимости от наличия объекта и равномерно освещает поле зрения, создавая постоянный фон. Если запаздывание фаз откладывать по часовой стрелке, то вектор $\overline{O_1B}$ изобразит световую волну, прошедшую через непоглощающий элемент объекта и набравшую в нем отставание по фазе, равное δ. Так как длины обоих векторов равны, то такой элемент не будет виден на общем фоне. Конец вектора для другого элемента объекта, вносящего разность фаз δ, будет находиться в точке B'. Очевидно, что конец вектора для любого элемента будет лежать на окружности с радиусом O_1A, имеющей центр в точке O_1.

Вектор $\overline{O_1B}$ можно представить как сумму двух векторов: $\overline{O_1A}$ и $\overline{AB}$, разность фаз между которыми приблизительно равна $\pi/2$. Сопоставление этого представления с дифракционной теорией и выводами математического анализа приводит к заключению, что волна, прошедшая через элемент структуры, есть результат векторного сложения недифрагированной прямой волны, описываемой вектором $\overline{O_1A}$ (нулевой максимум), и дифрагированной волны, характеризуемой вектором $\overline{AB}$ (первый максимум).

Если искусственным путем сдвинуть фазу колебаний нулевого максимума на $\pi/2$, то его следует изобразить вектором $\overline{O_1A_1}$. Теперь, перенеся вектор дифрагированного света $\overline{AB}$ в новое положение $\overline{A_1B_1}$ и сложив его с вектором $\overline{O_1A_1}$, получим вектор изображения объекта $\overline{O_1B_1}$. Его длина меньше длины вектора прямого света, создающего общий фон изображения. Таким образом, изменение фазы, вызванное разностью показателей преломления объекта и среды, превращается в изменение амплитуды и изображение объекта становится видимым.

Если сделать аналогичные построения для элемента, вносящего разность фаз δ', то его изображение будет представляться вектором $\overline{O_1B_1'}$. Точки B_1, B_1' и концы других векторов, соответствующих элементам структуры различной толщины или с различными показателями прелом-

ления, лежат на одной окружности. Радиус окружности OA_1 по величине равен радиусу первоначальной окружности O_1A.

Векторы, концы которых расположены на дуге A_1B_3, а начало — в общей точке O_1, короче вектора $\overline{O_1A_1}$. Из этого следует, что элементы с показателем преломления большим, чем у окружающей их среды, и вносящие разность фаз от 0 до $\pi/2$ будут видны темными на светлом фоне.

При разности фаз $\pi/2$ (точка B_3) результирующий вектор $\overline{O_1B_3}$ равен по величине вектору $\overline{O_1A_1}$ и соответствующий ему элемент не будет виден в поле зрения. Если же разность фаз, вносимая объектом, больше $\pi/2$, то результирующий вектор будет больше вектора $\overline{O_1A_1}$, и тогда объект станет светлее фона, т. е. наступит *инверсия* изображения. Это явление часто называют *обращенным контрастом*.

В рассмотренном случае недифрагированному свету было дано опережение по фазе на $\pi/2$. Этот случай известен как *позитивный* фазовый контраст.

Можно представить второй случай — когда недифрагированный свет задерживается по фазе на $\pi/2$. Тогда вектор $\overline{O_1A}$ следует развернуть и перенести в положение $\overline{O_2A_1}$. Начало всех векторов, соответствующих различным элементам, переместится в точку O_2, а их концы будут оставаться на той же окружности с центром в точке O. Длина векторов $\overline{O_2B_1}$, $\overline{O_2B_1'}$, $\overline{O_2B_2}$ и т. д. больше длины вектора $\overline{O_2A_1}$. Из этого следует, что объекты будут видны более светлыми, чем фон. В этом случае имеет место *негативный* фазовый контраст. Из диаграммы видно, что при негативном контрасте инверсия изображения появляется для очень больших разностей фаз, а именно в точке B_4, соответствующей разности фаз $\delta = 3\pi/2$.

Теперь следует вернуться к позитивному контрасту. При малых разностях фаз δ, что чаще всего встречается на практике, длины векторов $\overline{O_1B_1}$ и $\overline{O_1A_1}$ мало отличаются друг от друга, и поэтому контраст изображения хотя и имеется, но он невелик. Контраст можно повысить, если начало векторов из точки O_1 перенести в точку O_3, так как тогда, очевидно, разность между длинами векторов $\overline{O_3B_1}$ и $\overline{O_3A_1}$ станет больше разности длин векторов $\overline{O_1A_1}$ и $\overline{O_1B_1}$. Перенос начала в другую точку соответствует уменьшению вектора $\overline{O_1A_1}$. Достигается это путем уменьшения амплитуды прямого недифрагированного света. Однако в таком случае следует иметь в виду, что и инверсия изображения наступит при меньшей разности фаз, а именно в точке B_2, для которой длины векторов $\overline{O_3A_1}$ и $\overline{O_3B_2}$ равны друг другу.

Надо сказать, что, хотя инверсия наступает в точке B_2, диапазон, в пределах которого можно работать, на самом деле вдвое меньше области необращенного контраста. Этот диапазон ограничен точкой пересечения окружности с линией, соединяющей точки O и O_3. Такое положение объясняется тем, что одному и тому же значению контраста соответствуют две разности фаз, т. е. объекты, вносящие отличные друг от друга разности фаз, будут видны одинаково темными и у наблюдателя возникает ложное толкование.

П р а к т и ч е с к о е о с у щ е с т в л е н и е м е т о д а ф а з о в о г о к о н т р а с т а достигается следующим образом. Как видно на рис. 33, где представлена принципиальная оптическая схема фазово-контрастного микроскопа, в передней фокальной плоскости конденсора *2* вместо обычной ирисовой апертурной диафрагмы установлена кольцеобразная диафрагма *1*, которая конденсором *2* и объективом *4* изображается

в выходном зрачке объектива вблизи заднего фокуса. Здесь помещена фазовая пластинка 5 с фазовым кольцом. Размеры кольца равны размерам изображения кольцевой диафрагмы конденсора, так что фазовое кольцо закрывает весь свет, прямо прошедший сквозь препарат 3 (сплошные линии).

Действие фазового кольца двоякое. Во-первых, оно поглощает значительную часть прямо прошедшего света ($\tau = 0.25$), для чего в нем нанесена полупрозрачная пленка металла. Во-вторых, оно сдвигает фазу световых колебаний приблизительно на $\Theta = \pi/2$.

Свет, дифрагированный препаратом 3 (штриховые линии), проходит мимо фазового кольца и не претерпевает ни ослабления, ни сдвига фазы.

Стеклянная фазовая пластинка 5 имеет кольцо в виде выгравированной или вытравленной канавки, благодаря чему лучи, не отклоненные объек-

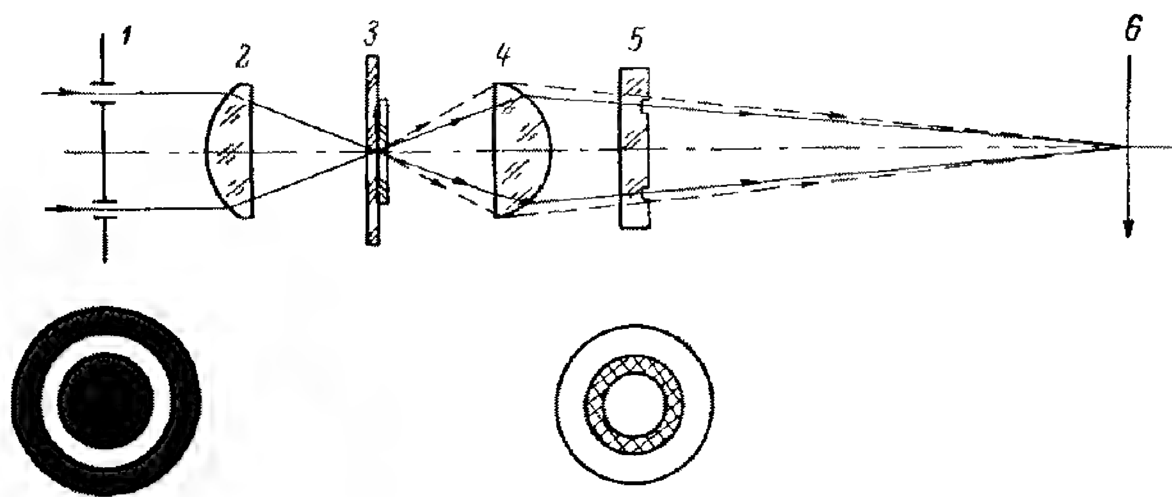


Рис. 33. Принципиальная оптическая схема фазовоконтрастного микроскопа.

том, проходят в пластинке несколько меньший слой стекла чем дифрагированные лучи. Поэтому фаза прямо прошедшего света опережает фазу дифрагированного. Таким образом, осуществляется позитивный фазовый контраст и в плоскости 6 получается контрастное изображение, в котором бо́льшим показателям преломления препарата соответствуют более темные участки.

Для негативного фазового контраста кольцо на пластинке получают не вытравливанием, а нанесением на поверхность стекла тонкой кольцеобразной пленки прозрачного вещества. Получается выпуклое фазовое кольцо, которое вносит запаздывание в прямо прошедший свет. В этом случае объекты с показателем преломления бо́льшим, чем у среды, выглядят светлее окружающего фона.

Разновидностью негативного фазового контраста является *фазово-темнопольный (аноптральный) контраст*. В этом случае кольцо фазовой пластинки пропускает лишь незначительную часть света (около 5%, тогда как при обычном фазовом контрасте около 25%) и имеет больший диаметр. Так, если наружные диаметры колец в фазовоконтрастных объективах равны приблизительно 0.3—0.4 диаметра выходного зрачка, то в фазово-темнопольных объективах они равны 0.8—0.9 диаметра зрачка. Фазово-темнопольный контраст по сравнению с обычным фазовым имеет несколько повышенную чувствительность и применяется главным образом для наблюдения объектов, дающих весьма малые сдвиги фаз.

Д о с т о и н с т в а и н е д о с т а т к и метода фазового контраста, как и любого другого метода, определяются, во-первых, количеством и качеством информации, которую этот метод может дать, а во-вторых, доступностью, простотой и надежностью средств, необходимых для его осуществления.

Достоинства метода фазового контраста, благодаря которым он получил широкое распространение, — это простота и высокая надежность в работе устройств, позволяющих применять этот метод на практике. Причем разрешающая способность фазовоконтрастного микроскопа практически не отличается от разрешающей способности обычного микроскопа.

Чувствительность метода фазового контраста достаточно высока. Так, если считать, что минимально допустимый контраст должен быть равен 0.1, то с пластинкой $\Theta=\pi/2$ и $\tau=0.25$ можно будет наблюдать объекты, вносящие разность фаз не менее $\delta=0.025$ рад, что соответствует разности хода $\lambda/250$.

Недостатки метода фазового контраста происходят из природы явления. Рассмотренная теория применима в полной мере лишь к идеальному объекту, представляющему собой фазовую решетку. Реальные объекты значительно сложней: отдельные участки их могут отличаться друг от друга формой, размерами, толщиной и показателем преломления. Так как метод фазового контраста основан на разделении прямого и дифрагированного света и их последующей интерференции, то очевидно, что метод способен выявить участки в объекте, где имеются градиенты показателя преломления или толщины. При малых градиентах угол дифракции небольшой, и это не позволяет произвести достаточно хорошее разделение прямого и дифрагированного света. В результате такого несовершенства в фазовоконтрастном изображении будут выявлены лишь мелкие тонкие детали структуры, а в изображении больших грубых деталей контраст довольно быстро падает от края изображения к центру.

Так как объект не поглощает свет, то вся энергия излучения, проходящая через него, участвует в образовании изображения. Фазовое кольцо лишь перераспределяет энергию между различными участками объекта (поглощение фазового кольца в данном случае роли не играет, ибо оно ослабляет свет в равной мере для всех точек поля зрения). Следовательно, появление темных участков в изображении должно сопровождаться увеличением освещенности в соседних участках, и наоборот. В результате при позитивном фазовом контрасте изображения темных элементов структуры окружены светлыми ореолами, при негативном контрасте светлые изображения сопровождаются темными ореолами.

Метод интерференционного контраста

Интерференционный микроскоп в отличие от фазового свободен от указанных выше недостатков.

В белом свете интерференционный микроскоп может давать как черно-белые, так и цветные изображения.

Обычные фазовые микроскопы не позволяют измерять разность хода, возникающую при прохождении света через микроскопический объект. Интерференционная микроскопия дает возможность с помощью более или менее сложных устройств производить такие измерения, на основании которых затем могут быть вычислены, например, концентрация, вес сухого вещества в объекте и др. В этом главным образом и заключается та существенно новая количественная информация о микрообъекте, которую предоставляет интерференционная микроскопия.

Принцип действия любого двухлучевого интерференционного микроскопа основан на разделении светового луча на два и после прохождения каждого из этих лучей по своему тракту воссоединения их снова в один луч (рис. 34). Пучок параллельных лучей разделяется в плоскости A на две ветви. Соответствующая ему плоская световая волна W также расщепляется на две плоские когерентные волны W_1 и W_2. В нижней ветви можно поместить исследуемый прозрачный объект O, изменяющий фазу

светового колебания. Тогда после прохождения объекта фронт волны W_2 изменяется и она превращается в волну W'_2, на поверхности которой образуется впадина. Ее глубина определяет разность хода Δ, вводимую объектом:

$$\Delta = d\,(n_0 - n_c), \tag{84}$$

где d — толщина объекта; n_0 и n_c — показатели преломления соответственно объекта и среды. В верхней ветви волна W'_1, называемая волной сравнения, остается недеформированной.

В плоскости B волны W'_1 и W'_2 вновь соединяются и интерферируют между собой. Результат интерференции зависит от разности оптических длин верхней и нижней ветвей, или, иначе говоря, от расстояния между волнами W''_1 и W''_2, которое пропорционально этой разности. Действительно

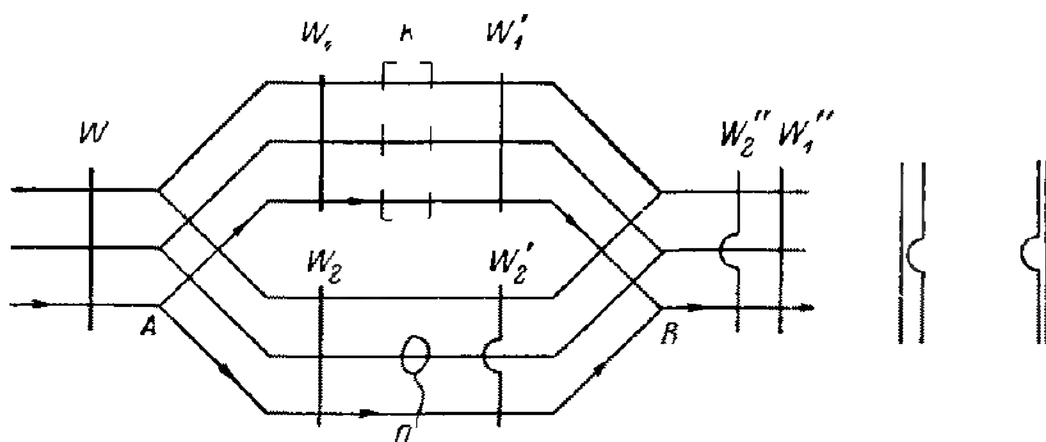


Рис. 34. Схема, поясняющая принцип действия интерференционного микроскопа.

если длина пути в верхней ветви меньше, то волна W''_1 уйдет вперед относительно волны W''_2.

При сравнительно большом расстоянии $W''_1\ W''_2$ интерференция наблюдается только в монохроматическом свете. Если расстояние $W''_1\ W''_2$ равно целому числу длин волн, то изображение объекта будет темным на светлом фоне. Если же длина $W''_1\ W''_2$ равна нечетному числу световых полуволн, то изображение получается светлым на темном фоне. Следует сказать, что эта общая характеристика результата интерференции справедлива тогда, когда разность хода, вносимая объектом, сама не равна целому числу волн. Очевидно, что разные детали объекта, вносящие отличные друг от друга сдвиги фаз в проходящую через них световую волну, будут проявляться в изображении с неодинаковым контрастом, т. е. освещенности их изображений будут неодинаковы. При освещении белым светом изображение объекта будет разноцветным.

Интерференция в белом свете наблюдается в том случае, когда длина $W''_1\ W''_2$ становится меньше 2 мкм, т. е. четырех длин волн ($\lambda = 0.5$ мкм).

Так как волны W_1 и W_2 проходят по независимым друг от друга путям, то в верхней ветви интерферометра может быть помещен компенсатор K, позволяющий медленно и непрерывно изменять оптическую длину верхней ветви. При этом волна сравнения W''_1, естественно, будет перемещаться относительно волны W''_2 параллельно самой себе вдоль оси прибора. На рисунке справа показаны два возможных положения волны сравнения. В первом положении эта волна соприкасается с дном впадины на волне W''_2, а во втором — с недеформированной частью волны W''_2. Моменты соприкосновения волн определяются при наблюдении интерференционных цветов. Если компенсатор снабжен приспособлением для отсчета величины перемещения волны W''_1, то разность отсчетов в двух описанных положениях волны сравнения, очевидно, будет равна глубине впадины Δ, т. е. разности хода, вносимой объектом.

Практическое воплощение принципиальной схемы интерферометра в микроскопе. Разделение и воссоединение интерферирующих световых пучков обычно производится одним из трех способов: с помощью оптических элементов из двоякопреломляющих кристаллов, зеркальной системы или дифракционным методом. Первый способ получил наибольшее распространение.

Основная особенность интерференционных микроскопов с кристаллической оптикой заключается в следующем: оба интерферирующих пучка проходят через одни и те же оптические элементы. Благодаря этому микроскопы такого типа сравнительно просты по устройству и удобны в обращении. С другой стороны, совмещение обеих ветвей интерферометра в одном оптическом тракте имеет тот недостаток, что принципиально нельзя

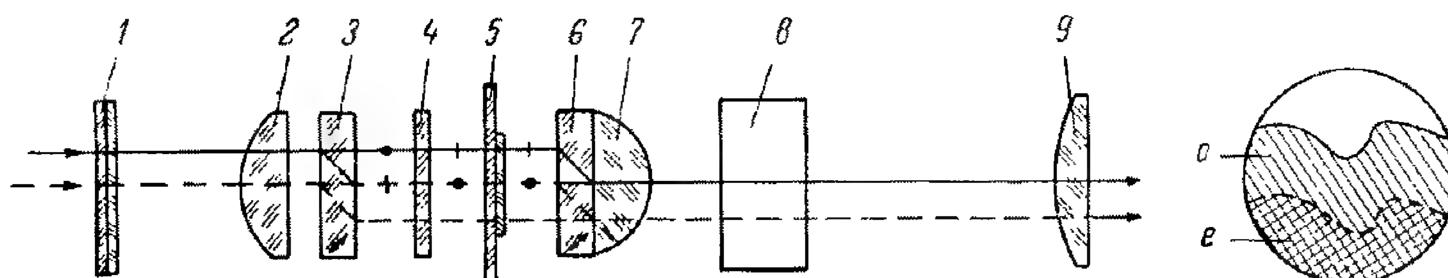


Рис. 35. Принципиальная оптическая схема интерференционно-поляризационного ширинг-микроскопа.

получить идеальную волну сравнения по всему полю зрения. Это приводит к ограничению размеров изучаемого объекта.

Первым микроскопом этого типа был поляризационный интерферометр А. А. Лебедева, предложенный в 1931 г. В ширинг-микроскопе (рис. 35), построенном по схеме Лебедева, лучи света, поляризованные поляроидом *1*, проходят через конденсор *2* и раздваиваются кальцитовой пластинкой *3*. Пластинка вырезана так, что ее кристаллооптическая ось составляет с оптической осью прибора угол, равный приблизительно 45°. После пластинки *3* лучи, поляризованные во взаимно перпендикулярных направлениях, проходят через пластинку «полволны» *4*, которая поворачивает плоскости поляризации лучей на 90°. Только при этом условии в данной схеме возможно будет затем компенсировать разность хода между обыкновенным и необыкновенным лучами, возникающую в пластинке *3*. На исследуемый элемент структуры препарата *5* попадет только один луч, а второй пройдет мимо. Кальцитовая пластинка *6*, установленная перед объективом *7*, соединяет раздвоенные ранее лучи и компенсирует разность хода между ними, возникшую в пластинке *3*. Кристаллооптическая ось у пластинки *6* расположена так же, как у пластинки *3*.

В системе всегда найдется второй луч, показанный на рисунке штриховой линией, который пройдет через тот же элемент структуры препарата, что и первый луч. Поэтому в фокальной плоскости окуляра *9* возникнет два изображения препарата. В поле зрения микроскопа, схематически показанном на рисунке справа, будут видны обыкновенное *o* и смещенное астигматическое необыкновенное *e* изображения. Величина смещения зависит от увеличения объектива и расстояния между раздвоенными лучами в плоскости препарата. Раздвоение лучей пропорционально толщине кальцитовой пластинки. Пластинка толщиной 1 мм раздваивает лучи на 0.11 мм. Очевидно, что исследованию доступен только тот участок препарата, который свободен от наложенного необыкновенного изображения. Поэтому желательно, чтобы величина раздвоения была бы возможно большей. С другой стороны, из-за ограниченного свободного расстояния между объективом и покровным стеклом препарата между ними нельзя поместить толстую кальцитовую пластинку. Это обстоятельство в какой-то

мере ограничивает возможности прибора. Так, для объектива 40 × 0.65 применяют пластинку толщиной 1.5 мм, раздваивающую лучи на 0.165 мм.

Разность хода между лучами, прошедшими через объект и мимо объекта, измеряется с помощью компенсатора *8* обычного типа.

Исследования непрозрачных объектов по методу интерференционного контраста можно, в частности, производить с помощью оригинального интерференционного микрообъектива Захарьевского, схема которого приведена на рис. 36. Объектив имеет большое свободное расстояние, апертуру 0.5, фокусное растояние $f'=10$ мм и рассчитан на длину тубуса ∞. Интерференционный узел объектива состоит из двух плоско-параллельных пластинок одинаковой толщины *3* и *4*. Пластинка *3* после нанесения на нее маленькой зеркальной площадки *2* приклеена к фронтальной линзе системы *1*. Со стороны линзы зеркальная площадка покрыта черным непрозрачным лаком. Нижняя поверхность пластинки *4* покрыта светоделительным слоем и располагается посередине между зеркалом *2* и поверхностью изучаемого объекта *5*.

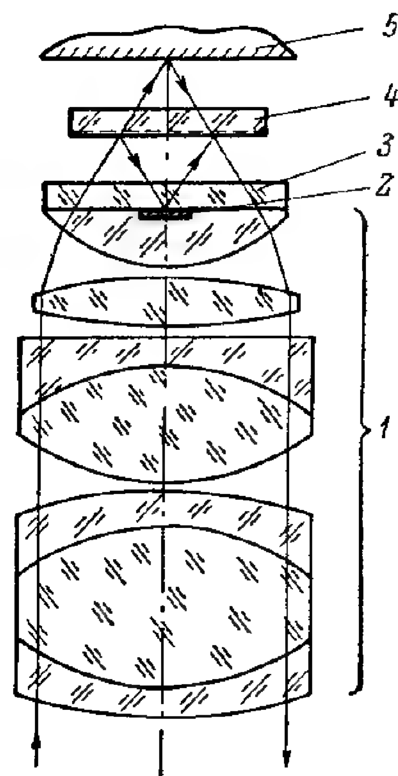


Рис. 36. Оптическая схема интерференционного микрообъектива Захарьевского.

Луч света из осветительной системы проходит через объектив и, достигнув пластинки *4*, раздваивается. Один луч, не меняя направления, падает на объект *5* и отражается к пластинке *4*. Второй луч зеркалом *2* также возвращается к пластинке *4*. Здесь лучи воссоединяются, интерферируют и направляются через линзовую систему *1* в окуляр микроскопа.

Таким образом, объектив дает систему интерференционных полос равной толщины, локализованную на поверхности наблюдаемого объекта. Ширина и направление полос зависят от наклона поверхности объекта по отношению к объективу.

Для исследования методом интерференционного контраста интерференционные полосы делают настолько широкими, чтобы по всему полю зрения микроскопа наблюдалась равномерная интерференционная окраска. Если какие-либо элементы структуры будут находиться выше или ниже поверхности объекта, то окраска их изображений будет меняться в зависимости от их высоты.

Для измерения профиля поверхности объект наклоняют на такой угол, чтобы в поле зрения микроскопа наблюдались узкие интерференционные полосы. Профиль поверхности оценивается по смещению полос.

Метод исследования в свете флуоресценции

Принцип действия флуоресцентного микроскопа, как это видно из схемы (рис. 37, *а*), с точки зрения геометрической оптики не отличается от обычного микроскопа. Разница заключается лишь в том, что осветительная система *1* снабжена светофильтром *4* для выделения возбуждающего излучения, а в наблюдательной системе *3* помещен запирающий светофильтр *5*. Светофильтр *4* пропускает лишь коротковолновое (например, фиолетовое) излучение источника, показанное условно сплошными линиями. Под действием падающей энергии препарат *2* флуоресцирует, испуская обычно более длинноволновое излучение (например, желтое), показанное штриховыми линиями. Светофильтр *5* не пропускает возбуждающее излучение, и таким образом препарат виден в свете его флуоресценции. Возбуждающее излучение может направляться на препарат также и через объектив с помощью опак-иллюминатора (рис. 37, *б*).

Энергетический выход флуоресценции незначителен. Поэтому в данном случае стремятся применять высокоапертурные объективы и мощные источники света (например, ртутные и ксеноновые лампы сверхвысокого давления).

Кроме того, к оптической системе флуоресцентного микроскопа предъявляются следующие специфические требования: 1) высокая степень скрещенности светофильтров (т. е. отсутствие света в поле зрения окуляра, если

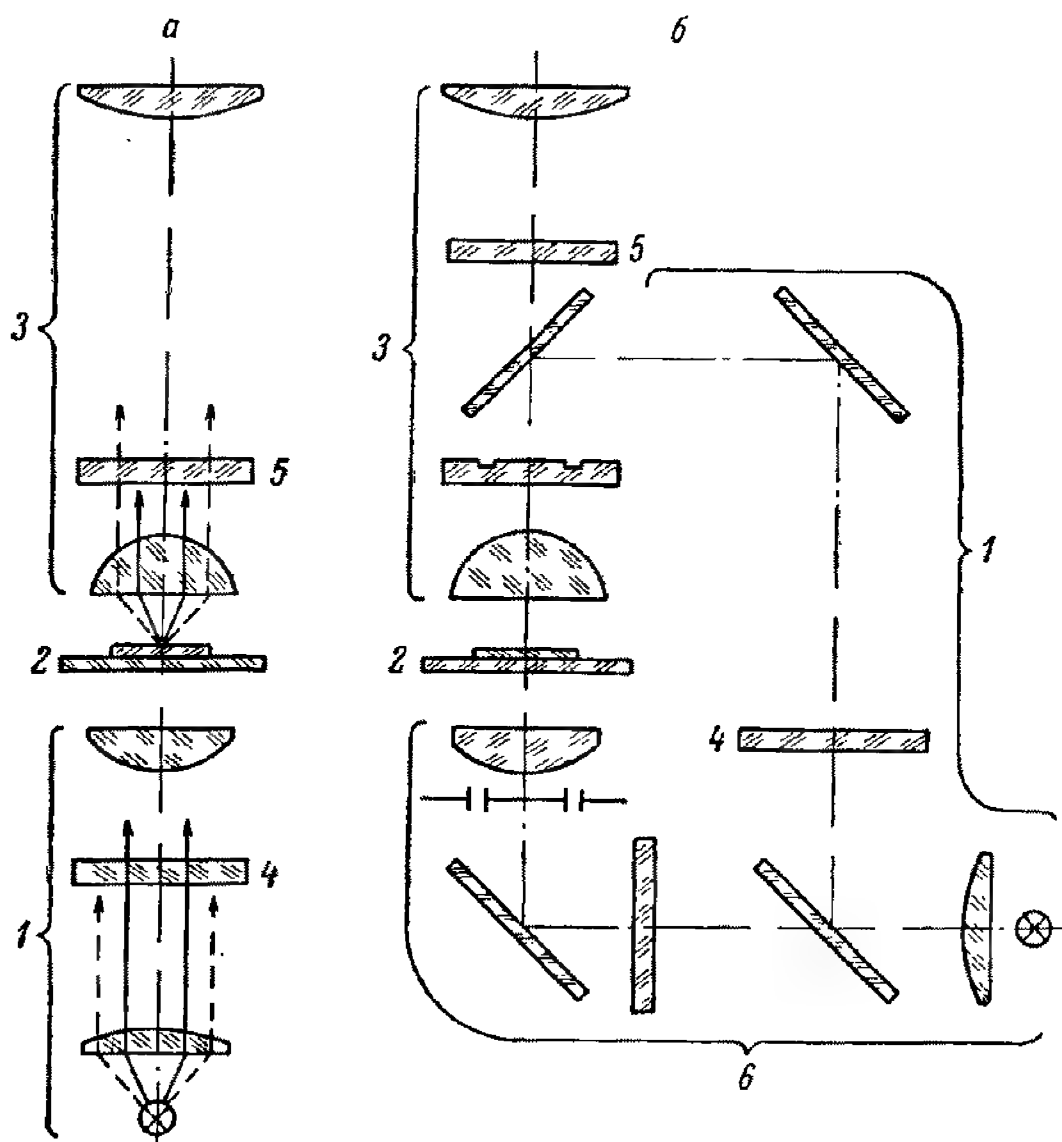


Рис. 37. Принципиальная оптическая схема флуоресцентного микроскопа.

а — освещение препарата через конденсор; б — освещение препарата через объектив и способ комбинированного освещения.

объект не флуоресцирует); 2) отсутствие флуоресценции стекол и склеивающих веществ оптической системы, а также иммерсионного масла; 3) в случае применения опак-иллюминатора с пластинкой, имеющей интерференционное светоделительное покрытие, последнее должно действовать как хорошо скрещенные светофильтры.

В микроскопах, предназначенных для наблюдения ультрафиолетовой флуоресценции, какой обладают, например, многие биологические объекты, применяют оптические элементы, изготовленные из прозрачных для ультрафиолетового излучения материалов (кварц, флюорит). При исследовании, например, некоторых минералов необходимо коротковолновое возбуждающее излучение, что также заставляет пользоваться осветительной системой с кварц-флюоритовой оптикой.

Возможны случаи, когда в препарате флуоресцируют лишь небольшие детали. Тогда может оказаться, что в поле зрения на темном фоне светятся только некоторые участки структуры и поэтому нельзя установить, какие именно элементы видны. Преодолеть это затруднение можно с помощью *комбинированного* освещения, один из способов осуществления которого заключается в следующем. Флуоресценция наблюдается при направлении возбуждающего излучения на препарат сверху, через объектив; одновре-

менно препарат с помощью оптической системы *6* освещают (излучением более длинноволновым, нежели свет флуоресценции) снизу через конденсор для наблюдения по методу фазового контраста. При этом флуоресцирующие элементы видны одновременно со всей структурой препарата, выявляемой фазовым контрастом.

Метод исследования в спектральных диапазонах за пределами видимой области

Ультрафиолетовая микроскопия. Интерес, который представляет ультрафиолетовая микроскопия, определяется следующими обстоятельствами:

1) так как длина волны ультрафиолетовых лучей меньше, чем видимых, то ультрафиолетовый микроскоп должен иметь разрешающую способность приблизительно вдвое выше, чем обычный;

2) многие прозрачные и бесцветные в видимой области спектра объекты (например, биологические неокрашенные ткани и клетки) обладают избирательным поглощением в коротковолновой области, и поэтому микроскопирование в ультрафиолетовых лучах позволяет увидеть их структуру.

В настоящее время ультрафиолетовая микроскопия применяется для работы в спектральном диапазоне от видимой области до 250 нм. Одна из основных трудностей, с которой сталкиваются в этом диапазоне, состоит в том, что нет такого разнообразия материалов, используемых для оптических деталей, как в обычной микроскопии; только здесь применяется зеркальная и кварц-флюоритовая оптика.

Использование фотографии для преобразования невидимого ультрафиолетового изображения в видимое обеспечивает более высокое качество, нежели, например, флуоресцирующий экран или электронно-оптический преобразователь.

Инфракрасная микроскопия появилась сравнительно недавно в связи с необходимостью изучать объекты, имеющие селективное поглощение в инфракрасной области спектра. Очевидно, что в первую очередь этот метод представляет интерес в исследованиях объектов, совершенно непрозрачных в видимой области, таких, как полупроводниковые монокристаллы, некоторые биологические препараты, многие минералы и т. д. Однако метод может быть полезен также и в случае объектов, прозрачных в видимой области, если эти объекты в инфракрасной области имеют более характерные полосы поглощения.

Так как разрешающая способность микроскопа обратно пропорциональна длине световой волны, то при работе в инфракрасной области особенно необходимы высокоапертурные объективы.

Исследования в спектральном диапазоне до 1.2 мкм проводятся с помощью обычной стеклянной оптики. Так как выбор фотографических материалов в этом диапазоне невелик, то фотография применяется не только для трансформации невидимого изображения в видимое, но и для съемки изображения на экране электронно-оптического преобразователя.

Таким образом, принципиально как ультрафиолетовый, так и инфракрасный микроскопы отличаются от приборов, работающих в видимой области, только наличием преобразователей изображения и светофильтров для выделения соответствующих спектральных диапазонов.

8. ПРОХОЖДЕНИЕ СВЕТА ЧЕРЕЗ МИКРОСКОП

Если поток излучения (рис. 38), прошедший через площадку входного люка, пройдет затем через площадку входного зрачка объектива, то поверхность, опирающаяся на контуры этих площадок, ограничивает *световую*

трубку, в пределах которой распространяется поток. Соединив лучами каждую точку площадки *1* с каждой точкой площадки *2*, можно убедиться в основном свойстве световой трубки: ни один луч, проведенный таким образом, не выйдет за ее пределы. При этом предполагается, что среда, в которой находится световая трубка, оптически однородна и имеет показатель преломления n. Данное определение распространяется также на пространства между площадками *3* и *4*, а также *5* и *6*, где показатель преломления равен n'.

Для световой трубки доказано, что в любом ее сечении выполняется инвариант

$$nl \sin u = \text{const}, \tag{85}$$

где n — показатель преломления; l — радиус площадки, ограниченной световой трубкой; u — угол между осью и образующей телесного угла,

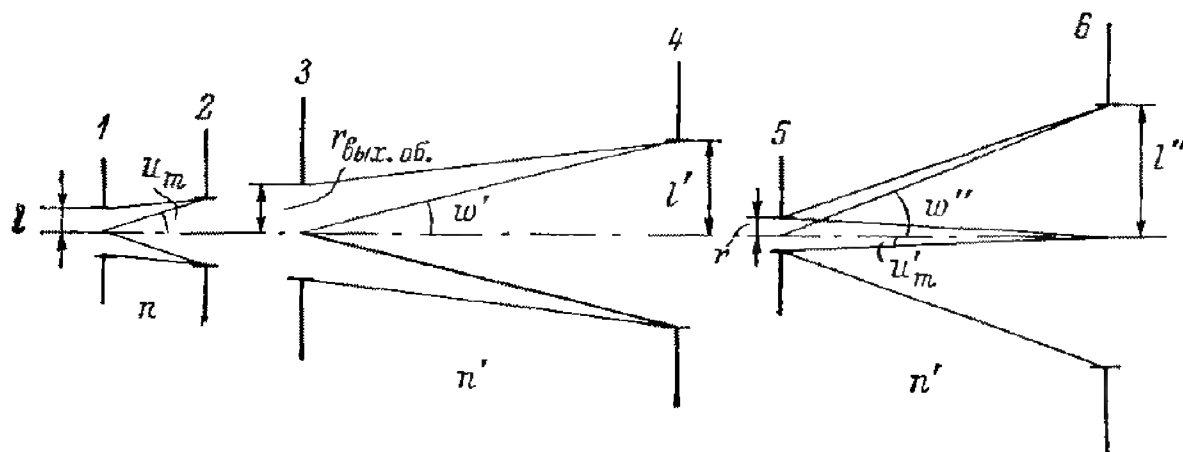


Рис. 38. Представление оптической системы микроскопа в виде световой трубки.

1 — входной люк-плоскость препарата; *2* — входной зрачок объектива; *3* — выходной зрачок объектива; *4* — полевая диафрагма окуляра; *5* — выходной зрачок микроскопа; *6* — выходной люк микроскопа — плоскость изображения.

в пределах которого распространяется излучение и вершина которого лежит в центре площадки радиуса l. Применительно к рис. 38 это выражение можно записать в виде

$$nl \sin u_m = n' r_{\text{вых. об}} \sin w' = n' r \sin w'' = n' l'' \sin u'_m.$$

Так как для сопряженных плоскостей $\beta = l''/l$, то отсюда вытекает, что

$$\beta = \frac{l''}{l} = \frac{n \sin u_m}{n' \sin u'_m} = \frac{A}{A'}. \tag{86}$$

В микроскопе всегда $n' = 1$.

Из сказанного следует, что величина светового потока, проходящего через трубку, не изменяется на всем ее протяжении, если не принимать во внимание потери потока на отражение, поглощение и рассеяние средами, в которых эта трубка образована. Если же учесть все эти потери, то, введя коэффициент пропускания оптической системы микроскопа, можно охарактеризовать яркость выходящего из прибора светового пучка следующим образом:

$$B' = \tau B, \tag{87}$$

где B — яркость источника света.

Потери лучистой энергии, которые всегда имеют место при прохождении потока излучения через реальную оптическую систему, определяются в основном следующими тремя факторами.

1) Потери из-за рассеяния или дифракции. Неизбежные неоднородности оптических сред (свили, пузырьки), а также всегда имеющиеся на поверхностях оптических деталей мельчайшие пылинки и дефекты самих поверхностей дифрагируют (отклоняют) попадающий на них поток. Этот поток не участвует в образовании изображения. Потери из-за рассеяния невелики по сравнению с другими видами потерь

и нежелательны главным образом потому, что они приводят к уменьшению контраста изображения.

2) П о т е р и в с л е д с т в и е п о г л о щ е н и я обычно невелики, так как для оптических деталей применяются среды, прозрачные в используемом спектральном диапазоне. Наиболее разнообразен выбор мало поглощающих материалов для видимой области спектра. В случае работы в ультрафиолетовом или инфракрасном спектральном интервале потери от поглощения могут быть значительными. Большие потери имеют место также в светофильтрах.

Коэффициент светопоглощения 1 см оптического стекла в видимой области спектра колеблется обычно от 0.4 до 1.5%, но иногда достигает 5%. Если принять коэффициент светопоглощения равным 0.01, то коэффициент пропускания оптической системы, в которой поток излучения проходит толщину стекла d, будет равен

$$\tau_п = 0.99^d. \qquad (88)$$

3) П о т е р и с в е т а н а о т р а ж е н и е. Каждая преломляющая поверхность отражает часть падающего на нее потока излучения. Эта часть не участвует в образовании изображения и составляет наибольшую долю рассеянного в приборе света. Таким образом, из-за потерь на отражение не только уменьшается полезный поток, но ухудшается и качество изображения. Последнее проявляется в том, что изображение покрывается общей вуалью, снижающей контраст.

Величина потока, отраженного преломляющей поверхностью, определяется по формулам (25) и (28), т. е.

$$\rho_0 = \left(\frac{n' - n}{n' + n}\right)^2. \qquad (89)$$

Если принять для легких кроновых стекол $n' = 1.5$, а для тяжелых флинтов $n' = 1.65$, то коэффициент отражения поверхности, разделяющей воздух и стекло, будет соответственно равен $\rho_к = 0.04$ и $\rho_ф = 0.06$. Коэффициент пропускания оптической системы, имеющей $N_к$ кроновых поверхностей, граничащих с воздухом, и $N_ф$ флинтовых, можно подсчитать по формуле

$$\tau_0 = (1 - \rho_к)^{N_к} (1 - \rho_ф)^{N_ф}. \qquad (90)$$

Общий коэффициент пропускания оптической системы равен произведению коэффициентов пропускания, обусловленных поглощением $\tau_п$ и отражением τ_0:

$$\tau = \tau_п \tau_0 = (1 - \rho_к)^{N_к} (1 - \rho_ф)^{N_ф}\, 0.99^d \approx 0.96^{N_к} \cdot 0.94^{N_ф} \cdot 0.99^d. \qquad (91)$$

Для примера можно подсчитать коэффициент пропускания микроскопа, схема которого приведена на рис. 27, а характеристики элементов в табл. 2.

ТАБЛИЦА 2

Некоторые характеристики элементов оптической системы микроскопа

Элемент	Количество линз	Толщина стекла, мм	Количество поверхностей, граничащих с воздухом	
			кроновых	флинтовых
Коллектив	2 одиночные	10.3	2	2
Зеркало		2	2	
Конденсор	2 одиночные	21	4	
Объектив 40×0.65	1 одиночная, 2 пары склеенных	7.3	4	2
Окуляр 7×	2 одиночные	5.5	4	
	Итого	46.1	16	4

Коэффициент пропускания микроскопа по формуле (91) равен $\tau = 0.96^{16} \cdot 0.94^{4} \cdot 0.99^{4,6} = 0.37$. Таким образом, через микроскоп пройдет только одна треть потока излучения.

Особенно вреден поток, отраженный какой-либо поверхностью, когда он другой поверхностью или частью оптической системы фокусируется в поле зрения микроскопа. Тогда в поле зрения наблюдается более или менее четко очерченное светлое пятно, занимающее только часть поля. Это не дает возможности получить равномерное освещение. Устранить такой неприятный дефект можно лишь путем соответствующего расчета оптической системы или применением просветляющих покрытий.

Просветляющие покрытия уменьшают коэффициент отражения преломляющей поверхности в 3—8 раз. Поэтому их применение позволяет значительно уменьшить потери на отражение.

9. ОСВЕЩЕННОСТЬ ИЗОБРАЖЕНИЯ

Освещенность фотопластинки, представленной на рис. 39 меридиональным сечением LL, создается пучками лучей, выходящими из зрачка микроскопа, имеющего площадь s. Зрачок можно рассматривать как источник света, яркость которого равна B'.

Согласно формулам (11) и (16), освещенность элементарной площадки $d\sigma$, вырезаемой в центре пластинки элементарным телесным углом $d\omega$, равна

$$E = \frac{B' s d\omega}{d\sigma}. \qquad (92)$$

Рис. 39. К выводу формулы освещенности пластинки.

В соответствии с определением телесного угла $d\omega = d\sigma / x'^2$. Тогда выражение (92) можно записать в виде

$$E = \frac{B' s}{x'^2} = \frac{\pi B' r^2}{x'^2} = \pi B' \operatorname{tg}^2 u'_m, \qquad (93)$$

где r — радиус зрачка микроскопа. Ввиду малости угла u'_m его тангенс можно заменить синусом и тогда

$$E = \pi B' \sin^2 u'_m, \qquad (94)$$

где $\sin u'_m$ представляет собой выходную апертуру микроскопа A', связанную со входной апертурой, которую обычно применяют для характеристики прибора, соотношением (86). Кроме того, если яркость зрачка из выражения (87) заменить яркостью источника света, то формула (94) примет вид:

$$E_0 = \tau \pi B \sin^2 u' = \tau \pi B \frac{A^2}{\beta^2}, \qquad (95)$$

где A — апертура объектива; β — масштаб изображения на экране.

Освещенность в любой внеосевой точке пластинки, как показывают соответствующие расчеты, равна

$$E = E_0 \cos^4 w. \qquad (96)$$

Таким образом, освещенность к краю пластинки убывает пропорционально четвертой степени косинуса угла направления светового потока.

Угол ω, т. е. половина углового размера изображения на пластинке, обычно равен 10—20°, но иногда достигает 25°. При $\omega = 20°$ освещенность на краю пластинки будет на одну треть меньше освещенности в центре.

Из формулы (95) следует, что освещенность на пластинке зависит от коэффициента пропускания микроскопа, яркости источника, апертуры объ-

ектива и масштаба изображения. При заданных апертуре и увеличении освещенность можно повысить только путем уменьшения потерь света в приборе или увеличением яркости источника. Нельзя, например, повысить освещенность, увеличивая апертуру коллектора и тем самым увеличивая световой поток, «отбираемый» коллектором из всего излучения светящегося тела. В этом случае не будет выполнено условие инварианта (85), что приведет к экранированию света в приборе.

Практически почти никогда микроскоп не работает в таких условиях, при которых освещенность изображения E может быть вычислена по формуле (96). Объясняется это при каждом методе исследования своими причинами.

Метод светлого поля. Апертурную диафрагму конденсора обычно открывают настолько, чтобы диаметр ее изображения в плоскости выходного зрачка объектива был равен двум третям диаметра зрачка. Реальная освещенность будет тогда равна $E_{\text{р}} = \frac{4}{9} E$.

Метод косого освещения. Недифрагированный свет заполняет не весь выходной зрачок объектива. Если площадь зрачка — s, а площадь освещенного участка зрачка — s_1, то реальная освещенность равна $E_{\text{р}} = \frac{s_1}{s} E$. Например, при исследовании непрозрачных объектов с применением призмы Наше, занимающей половину зрачка, $E_{\text{р}} = 0.5E$.

Метод темного поля. Реальная освещенность зависит не только от яркости источника B, но и от свойства препарата рассеивать падающий на него свет. Количество светового потока, дифрагированного на элементах микроструктуры препарата в данном направлении, зависит от длины волны света, размеров отдельных частиц или толщины границ раздела между элементами препарата, угла между освещающим пучком и направлением наблюдения и других причин. Лишь в некоторых частных случаях можно подсчитать яркость объекта, которую следует подставлять в формулу определения освещенности.

Метод фазового контраста. Размер и форма выходного зрачка микроскопа определяются не выходным зрачком объектива, а кольцевой диафрагмой конденсора и фазовым кольцом в объективе. Реальную освещенность можно вычислить по формуле $E_{\text{р}} = (p^2 - q^2)E$, где p и q — коэффициенты, характеризующие, какую часть радиуса зрачка составляют соответственно наружный и внутренний радиусы фазового кольца. Величина $(p^2 - q^2)$ для слабых объективов приблизительно равна 0.17, а для средних и сильных — 0.07.

Метод интерференционного контраста. При определении коэффициента пропускания микроскопа, в котором использована интерференция поляризованных лучей, необходимо учитывать коэффициент пропускания двух поляроидов, равный приблизительно 0.25^2. Кроме того, следует иметь в виду, что в этих микроскопах, а также в интерференционных микроскопах других типов площадь выходного зрачка прибора определяется не зрачком объектива, а величиной осветительной апертуры. Последняя приблизительно вдвое меньше апертуры объектива. Поэтому реальная освещенность в микроскопах с кристаллооптикой равна $E_{\text{р}} = 0.25 \cdot 0.25^2 E$.

Метод исследования в поляризованном свете. В случае, когда оси поляризаторов параллельны, их коэффициент пропускания приблизительно равен 0.25^2, что необходимо учитывать при вычислении коэффициента пропускания всего микроскопа. Если же оси поляризаторов скрещены, то в отсутствие препарата освещенность равна 0. При введении препарата в ход лучей величина светового потока, прошедшего через прибор, будет определяться не только коэффициентом пропу-

скания, но и свойствами исследуемого анизотропного объекта и его ориентацией относительно осей поляризаторов. Это не дает возможности получить единую аналитическую формулу для определения реальной освещенности.

Следует напомнить, что исследование в ортоскопическом ходе лучей требует освещения препарата параллельным пучком света. Достигается это закрытием апертурной диафрагмы конденсора. Поэтому выходной зрачок микроскопа будет ограничен не изображением зрачка объектива, а изображением диафрагмы конденсора, которое надо использовать при расчете реальной освещенности.

Метод исследования в свете флуоресценции. Яркость свечения препарата зависит не только от яркости источника, примененного для освещения, но и от физико-химических свойств самого препарата. Кроме того, не весь препарат (по площади) флуоресцирует с одинаковой интенсивностью. По этим причинам здесь также нельзя получить для определения реальной освещенности единую аналитическую формулу, которой можно было бы характеризовать энергетические свойства только самого прибора.

Глава III

АППАРАТУРА ДЛЯ МИКРОФОТОГРАФИРОВАНИЯ

Конструкции многочисленных типов микроскопов значительно отличаются друг от друга, что вызвано их различным применением. Тем не менее каждый микроскоп имеет следующие основные узлы: объективы,

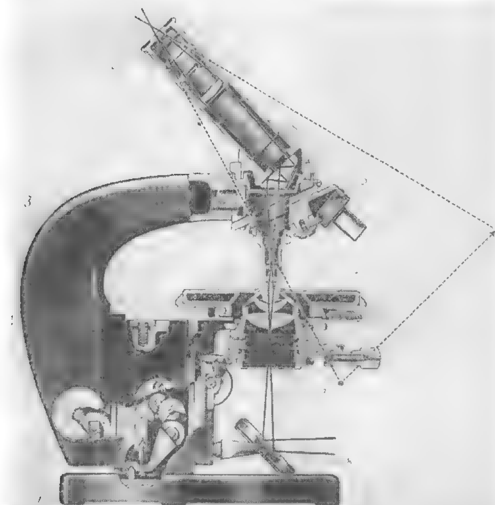


Рис. 40. Разрез биологического микроскопа типа МБР и ход лучей в нем.

окуляры, конденсор или опак-иллюминатор, штатив или корпус, предметный столик, тубус, устройство для крепления объективов (например, револьвер), механизмы грубой и точной фокусировки. Все эти узлы имеются,

например, в широко распространенном биологическом микроскопе, разрез которого приведен на рис. 40. Здесь же для наглядности дан и ход лучей в микроскопе. Штативом служит основание *1* с коробкой механизмов фокусировки *2* и тубусодержателем *3*. Под предметным столиком *6* находится конденсор *7* на кронштейне и зеркало *8*. На тубусодержателе установлены тубус *4* с окуляром и револьвер *5* с объективами. Кронштейн конденсора перемещается по высоте для настройки освещения по Кёлеру.

Более сложные микроскопы имеют массивные штативы, которые, в зависимости от их назначения, снабжены теми или иными узлами и механизмами, а также встроенными осветителями. В оптической системе таких приборов часто присутствуют дополнительные элементы, которые выполняют вспомогательную роль.

1. ОБЪЕКТИВЫ, ОКУЛЯРЫ И КОНДЕНСОРЫ

Микрообъективы

Микрообъектив является главным элементом оптической системы микроскопа, от которого в основном зависят свойства прибора. Поэтому качество объектива имеет большое значение. Широкое применение микроскопов для разнообразных исследований привело к тому, что потребовалось создать много типов объективов. Невозможно разработать универсальный объектив, который удовлетворял бы всем условиям работы. По оптическим характеристикам, конструкции и назначению микрообъективы делятся на несколько видов, которые можно классифицировать по различным признакам.

А. Степень исправления аберраций определяет качество изображения, даваемого объективом.

Ахроматические объективы — наиболее простые системы, у которых исправлена сферическая аберрация, кома и хроматическая аберрация положения для двух длин волн. У них заметен небольшой остаточный хроматизм положения, из-за чего контуры объектов имеют цветную кайму. Выполнение перечисленных условий заставляет усложнять оптическую систему объектива по мере увеличения апертуры. Объективы с апертурой до 0.1 состоят из одной ахроматической линзы. Для объективов с апертурой до 0.2 применяют систему из двух склеенных компонент. Это позволяет избавиться от крутых поверхностей. При переходе к апертурам до 0.65 двух компонент оказывается недостаточно и впереди добавляют обычно одну фронтальную линзу. Аберрации этой линзы компенсируются последующей частью системы. Для апертур свыше 0.65 система объектива еще больше усложняется.

Значительные аберрации вносит первая поверхность фронтальной линзы. Устранить их удается посредством применения однородной иммерсии, показатель преломления которой и дисперсия равны показателю и дисперсии стекла линзы. Благодаря этому на первой поверхности не происходит преломления света. Кроме того, иммерсия повышает апертуру объектива, а следовательно, и разрешающую способность. В качестве однородной иммерсии применяется кедровое или искусственное масло. Для увеличения апертуры применяются также неоднородные иммерсии, о которых сообщается ниже (стр. 107). Оптические константы иммерсионной жидкости входят в расчет объектива.

В объективах с большой апертурой фронтальная линза одиночная, неахроматизованная, что приводит к появлению хроматической разности увеличений. Для ее компенсации применяют окуляры, у которых эта аберрация имеет обратный знак.

Ахроматические объективы имеют значительную кривизну изображения, достигающую вблизи фокальной плоскости окуляра величины 15—

20 мм. Однако при визуальном наблюдении с этим можно мириться: частично этот недостаток компенсируется аккомодацией глаза, а частично перефокусировкой микроскопа. При микрофотографировании кривизна изображения приводит к тому, что на пластинке резким получается изображение препарата только в пределах трети поля зрения.

Апохроматические объективы — наиболее совершенные системы, у которых исправлены сферическая аберрация, астигматизм и кома. В отличие от ахроматов здесь улучшена хроматическая коррекция, т. е. устранен так называемый вторичный спектр, который дает в изображении цветные каймы. Благодаря применению большого числа преломляющих поверхностей и различных сортов стекол у этих объективов ахроматизация осуществлена для трех цветов, а хроматическая разность сферической аберрации почти совсем устранена. Поэтому в центре поля зрения апохроматы дают совершенно бесцветное изображение. Однако у них не совсем исправлена разность увеличений для различных длин волн, т. е. они имеют заметный хроматизм увеличений. Это приводит к небольшой окраске изображения в краевых зонах. Исправление такого недостатка осуществляется с помощью компенсационных окуляров, у которых хроматизм увеличения имеет обратный знак. Так же как и у ахроматов, система апохроматов усложняется по мере увеличения апертуры. Кривизна изображения у апохроматов достигает значительной величины.

Зеркально-линзовые объективы по степени исправления аберраций относятся к апохроматическим объективам. Здесь в оптическую систему наряду с линзами вводятся выпуклые, вогнутые и плоские зеркала. Применение зеркальных поверхностей, не имеющих по своей природе хроматизма, позволяет получить хорошо исправленную систему для широкой области спектра. Чаще всего такие объективы применяются для работы в ультрафиолетовой области спектра, для которой трудно создавать линзовые объективы из-за недостатка оптических материалов. Кроме того, зеркально-линзовые объективы имеют то преимущество перед линзовыми, что при равных апертурах и увеличениях рабочее расстояние у них больше, чем у линзовых.

Принципиально зеркально-линзовые объективы виньетируют (экранируют) центральную часть пучка лучей. Вследствие этого, во-первых, несколько уменьшается радиус диска Эри, а во-вторых, увеличивается освещенность первого кольца в дифракционном изображении точки. Первое обстоятельство должно приводить к увеличению разрешающей способности, но второе понижает контрастность изображения. В результате зеркально-линзовые объективы дают пониженную резкость изображения.

Полуапохроматические или флюоритовые объективы — системы, которые по исправлению хроматической аберрации занимают промежуточное положение между ахроматами и апохроматами.

Объективы-монохроматы применяются для сравнительно редких работ в узком спектральном интервале. У них преломление лучей равномерно распределено по поверхности нескольких линз, изготовленных из одного сорта стекла или кварца. Это дает возможность свести аберрации до минимума. Расчет системы облегчается отсутствием задачи ахроматизации.

Планобъективы — системы, у которых, кроме аберраций, устраненных в ахроматах и апохроматах, устранена также и кривизна изображения. В этих объективах по сравнению с предыдущими типами для уменьшения кривизны потребовалось увеличить число линз в системе и ввести компоненты сравнительно большой толщины. Планобъективы дают плоское изображение по всему полю зрения и поэтому имеют особенно большое значение для микрофотографии.

Б. Спектральная область применения объективов определяется их расчетом. Большинство объективов стеклянные и применяются для видимой и ближней инфракрасной области спектра. Для ультрафиолетовой области применяются зеркально-линзовые и кварц-флюоритовые объективы. В иммерсионных ультрафиолетовых системах используются только глицерин и вода, так как масло непрозрачно в коротковолновой области.

В. Длина тубуса, на которую рассчитан объектив, зависит от конструкции микроскопа. Выше говорилось об оптической длине тубуса. Однако обычно пользуются термином «*механическая длина тубуса*» или просто «*длина тубуса*». Под этим подразумевается расстояние от нижнего среза тубуса, в который упирается объектив, до верхнего среза тубуса, на который опирается окуляр. В отечественных микроскопах приняты длины тубуса 160, 190 мм и ∞ (бесконечность). В иностранных приборах, кроме того, встречаются длины тубуса 170, 215 мм и др. Объектив с тубусом ∞ проектирует изображение на бесконечное расстояние и используется в микроскопе совместно с тубусной линзой, которая переносит изображение из бесконечности в фокальную плоскость окуляра. Микроскоп с объективом этого типа имеет следующее преимущество. Если в сходящийся пучок лучей, который имеет место в случае объектива с конечной длиной тубуса, ввести наклонную стеклянную пластинку Бека, то появляется астигматизм. Кроме того, поляризационная оптика, установленная в сходящемся пучке лучей, снижает некоторые эксплуатационные характеристики прибора. Указанные недостатки отсутствуют, если пластинка Бека или поляризационная оптика помещаются в переменном пучке лучей. Осуществить это позволяет объектив с тубусом ∞.

Г. Объективы для проходящего света рассчитываются с учетом того, что между препаратом и объективом находится покровное стекло, закрывающее препарат. Покровное стекло вносит сферическую аберрацию тем большую, чем выше апертура объектива. Эта аберрация компенсируется сферической аберрацией обратного знака на фронтальной линзе.

Высокоапертурные (0.8—0.9) сухие системы очень чувствительны к отклонению в толщине покровного стекла, поэтому они изготовляются в коррекционных оправах с наружным вращающимся кольцом. При вращении кольца изменяется воздушный промежуток между линзами, чем исправляется сферическая аберрация, вносимая покровным стеклом нестандартной толщины. Кольцо снабжено шкалой толщины покровного стекла.

При объективах масляной иммерсии толщина покровного стекла не имеет значения. В этом одно из важных преимуществ иммерсионных объективов.

Д. Объективы для отраженного света применяются при исследовании непрозрачных объектов, например аншлифов металлов и минералов, которые не требуют покровного стекла. Поэтому покровное стекло в расчет объективов не входит. Среди объективов этого типа выделяются эпиобъективы, предназначенные для работы по методу темного поля. Здесь освещение объекта производится с помощью эпиконденсора — кольцевой системы (чаще всего зеркальной), расположенной вокруг обычного объектива.

Е. Фазовоконтрастные объективы по расчету соответствуют ахроматам или апохроматам и отличаются от них только тем, что на поверхности одной из линз, вблизи заднего фокуса объектива, нанесено фазовое кольцо.

Ж. Среди особенностей **конструкции оправ микрообъективов** здесь уместно отметить следующее.

а) так как сильные объективы имеют очень малое рабочее расстояние, доходящее до десятой доли миллиметра, то при фокусировке легко можно повредить фронтальную линзу, поэтому в последнее время сильные объективы начали изготовлять в пружинных оправах; при соприкосновении с препаратом внутренний цилиндр с оптической системой утапливается в наружном корпусе объектива;

б) в ряде случаев (например, при работе в темном поле) возникает необходимость уменьшить апертуру объектива, с этой целью некоторые типы сильных объективов снабжают ирисовой апертурной диафрагмой;

в) для подавляющего числа сухих объективов старой конструкции расстояние между опорной плоскостью и предметом равно 33 мм; у новых систем, в первую очередь у планобъективов, это расстояние составляет 45 *мм.*

Качество изображения объектива проверяется по виду дифракционного изображения точки, а также по мирам, испытательным пластинкам и путем сравнения с эталонными образцами. Все эти методы доступны в обычной микроскопической практике. О первом подробней сообщалось в гл. I, остальные не требуют особых пояснений.

Микропланары и корректары — объективы, составляющие самостоятельную группу и предназначенные для работы без окуляров. Эти объективы применяют для микросъемок с увеличениями до нескольких десятков крат. Рассчитываются они по типу фотообъективов, в которых стремятся исправить сферическую и хроматическую аберрацию, астигматизм, кому и дисторсию.

Окуляры

Окуляр микроскопа должен не только давать увеличенное изображение промежуточного изображения, созданного объективом, но и образовывать выходной зрачок микроскопа на таком расстоянии от окуляра, чтобы это было удобно для работы. Так как выходной зрачок объектива мал, то окуляр работает в узких пучках. Поэтому его сферическая, как и хроматическая, аберрация положения мала по сравнению с остаточными аберрациями объектива и не влияет на качество изображения микроскопа. В окуляре стремятся исправить астигматизм, кому, хроматическую разность увеличений и дисторсию.

Ортоскопические окуляры — линзовые системы, располагающиеся целиком позади промежуточного изображения, созданного объективом. Их фокусное расстояние не может быть большим, так как тогда зрачок будет изображаться далеко за окуляром, а это не очень удобно. Поэтому окуляры такого типа изготовляются только с небольшими фокусными расстояниями — от 9 до 20 *мм.* Эти окуляры имеют большое угловое поле зрения — от 40 до 50°.

Окуляры Гюйгенса состоят из двух одиночных линз. Передний фокус таких окуляров лежит внутри системы. Первая линза — коллектив — делает сходящимися главные лучи, выходящие из зрачка объектива, поэтому вторая линза — глазная — имеет небольшой диаметр. Коллектив несколько уменьшает размер изображения, даваемого объективом, как это видно на рис. 40. Выходной зрачок микроскопа располагается на небольшом расстоянии от окуляра. Увеличение окуляров Гюйгенса — от 4× до 15×.

Окуляры Рамсдена также состоят из двух одиночных линз, но передний главный фокус всей системы находится перед коллективом и, следовательно, полевая диафрагма находится не между линзами. В этих окулярах коллективная линза не понижает увеличение объектива. Подобную конструкцию имеют также окуляры Кельнера.

Как уже говорилось, сильные ахроматы и апохроматы имеют значительную хроматическую разность увеличений. Устранить этот недостаток можно путем введения в окуляр аберрации обратного знака. Такие окуляры называются компенсационными. Окуляры с увеличением от 3× до 10× представляют собой усложненный окуляр Гюйгенса. Окуляры с увеличением от 10 до 20× аналогичны по конструкции ортоскопическим окулярам.

Фотоокуляры рассчитываются как проекционные системы и предназначены для проектирования действительного изображения, применяются при фотографировании. Они несколько исправляют кривизну изображения. Однако кривизна изображения все же остается, и краевые зоны изображения получаются на фотографии нерезкими. Для получения фотоснимков, резких по всему полю зрения, применяются отрицательные системы, называемые гомалями. Визуальное наблюдение с ними производить нельзя, так как при них выходной зрачок расположен внутри микроскопа, где глаз не может быть помещен. Поле зрения гомалей приблизительно на одну треть меньше, чем у обычных окуляров.

Измерительные окуляры отличаются от других типов только тем, что они имеют в поле зрения сетку той или иной формы.

Конденсоры

Конденсоры микроскопа предназначены для освещения препарата различными методами.

Двухлинзовый конденсор по Аббе — наиболее распространенная система, применяемая для освещения препарата широким конусом проходящих лучей при наблюдении в светлом поле. Система снабжена ирисовой диафрагмой, выполняющей роль апертурной диафрагмы микроскопа. Если между фронтальной (верхней) линзой конденсора и предметным стеклом введена масляная иммерсия, то апертура конденсора равна 1.2.

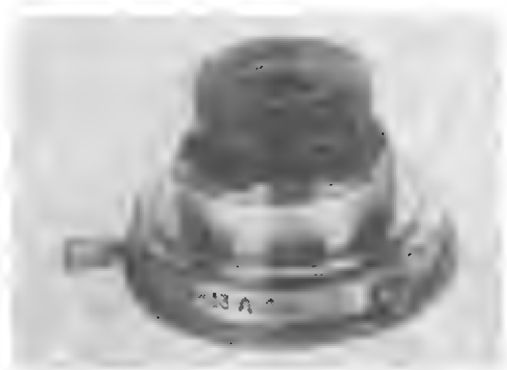


Рис. 41. Конденсор темного поля ОИ-13 фирмы ЛОМО.



Рис. 42. Конденсор для фазово-контрастного устройства КФ-4 фирмы ЛОМО.

Другой тип конденсора — апланатический — имеет апертуру 1.4 и может применяться с самыми сильными объективами. Кроме того, у него апертурная ирисовая диафрагма помещена в подвижной оправе, которая с помощью рукоятки может быть смещена в сторону от оптической оси микроскопа. Это позволяет осуществить косое освещение препарата наклонным пучком лучей. Величина смещения диафрагмы отсчитывается по миллиметровой шкале. Весь механизм поворачивается вокруг оптической оси, благодаря чему диафрагма может быть смещена в любую сторону. Разрез конденсора показан на рис. 40.

Оба эти конденсора неахроматизованы. В случае необходимости при микрофотографировании иногда применяют ахроматические конденсоры, которые являются довольно сложными системами из 5—6 линз.

Освещение по методу темного поля в проходящем свете производится с помощью специальных темнопольных конденсоров. Высокоапертурный конденсор, кроме преломляющих поверхностей, имеет асферические зер-

кальные поверхности. Этот конденсор (рис. 41) снабжен устройством для его центрирования относительно объектива. Устройство состоит из двух винтов и пружины (углы между ними равны 120°), с помощью которых перемещают оправу с оптическими элементами.

Разновидностью темнопольного конденсора является конденсор, основанный на цветовом контрасте. Его принцип действия отличается от иллюстрированного на рис. 28 следующим. В фокальной плоскости конденсора вместо кольцевой диафрагмы помещен синий светофильтр с прозрачным кольцом. В это кольцо вставлен красный светофильтр. В поле зрения микроскопа при таком конденсоре на синем фоне видны красноватые детали препарата. Такое устройство выпускала фирма К. Цейсс, Иена.

Конденсор для фазовоконтрастного устройства отличается от конденсора обычного типа тем, что в его фокальной плоскости кроме ирисовой апертурной диафрагмы помещен револьвер с кольцевыми диафрагмами (рис. 42). Каждая из последних имеет размеры, соответствующие определенному объективу. Револьвер снабжен двумя центрировочными винтами и пружинным упором, благодаря чему возможна центрировка изображения кольцевой диафрагмы относительно фазового кольца объектива.

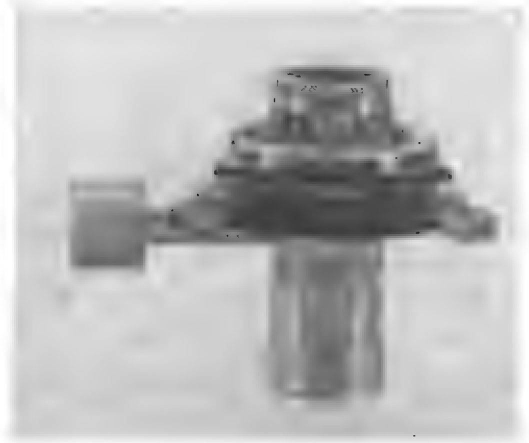


Рис. 43. Универсальный конденсор по Гейне фирмы Э. Лейтц.

Некоторые фирмы, например К. Рейхерт и Э. Лейтц, применяют специальный конденсор для комбинированного освещения препарата при его наблюдении одновременно в свете флуоресценции и по методу фазового контраста. В этом конденсоре возбуждающий свет проходит через синий светофильтр, помещенный в плоскости апертурной диафрагмы. Светофильтр выполнен из двух частей: круглого диска и кольца, которые расположены так, что между ними остается свободная кольцевая зона, соответствующая по размерам кольцевой диафрагме обычного фазовоконтрастного конденсора. Эта свободная зона закрыта красным светофильтром. В результате свет, возбуждающий флуоресценцию, проходит через синий светофильтр, а для наблюдения по методу фазового контраста служит красный свет.

Универсальные конденсоры позволяют производить освещение препарата при исследовании по методам светлого поля, темного поля и фазового контраста. В конденсоре по Гейне (рис. 43) при вращении рукоятки оптическая система перестраивается так, что апертура освещающего препарат полого конуса лучей плавно изменяется от минимальной до максимальной.

Следовательно, изменяется размер изображения кольцевой диафрагмы в выходном зрачке объектива. При этом возможны три варианта: а) изображение диафрагмы не совпадает с фазовым кольцом (освещение по методу как бы кругового косого освещения); б) изображение диафрагмы совпадает с фазовым кольцом (освещение по методу фазового контраста); в) изображение диафрагмы выходит за пределы зрачка объектива (освещение по методу темного поля).

Универсальный конденсор фирмы К. Цейсс, Иена имеет иную конструкцию. В нем применен револьвер со сменными конденсорами (для светлого и темного полей) и панкратическая система с одной кольцевой диафрагмой (для фазового контраста). Размер изображения кольцевой диафрагмы в выходном зрачке объектива изменяется с помощью панкратической системы. Конденсор, установленный на микроскопе, можно видеть на рис. 54.

2. ФАЗОВОКОНТРАСТНЫЕ УСТРОЙСТВА

Устройства для наблюдения прозрачных объектов по методу фазового контраста обычно состоят из набора объективов с фазовыми кольцами и конденсора с кольцевыми диафрагмами. И те и другие описаны в предыдущем параграфе. Для исследования непрозрачных объектов по методу фазового контраста существуют следующие два типа устройств: 1) набор объективов с фазовыми кольцами и кольцевых диафрагм для осветительной системы микроскопа, 2) приспособление для так называемого переноса зрачка и кольцевые диафрагмы к осветительной системе микроскопа.

Устройство первого типа аналогично описанному выше (см. гл. II). Во втором вспомогательная оптическая система перепроектирует выходной зрачок объектива в промежуточную плоскость, где помещается пластинка с фазовым кольцом. Это позволяет использовать в работе обычные объективы.

3. ИСТОЧНИКИ СВЕТА

Для микрофотографии наиболее существенное значение имеют следующие основные характеристики источников света.

1. Яркость источника света и ее стабильность во времени. Так как яркость определяет время экспозиции при фотографировании, то она должна быть достаточно большой. Колебания яркости могут повлиять на качество фотографии.

2. Спектральный состав излучения. От распределения энергии излучения по спектру зависит цветность источника света, а следовательно, и цвет освещенного им поля зрения микроскопа.

3. Форма и размеры светящегося тела. Тело должно иметь такую форму, чтобы его яркость была возможно более равномерной. Диаметр светящегося тела определяется инвариантом (85):

$$d_и = \frac{dA}{A_{кол}}, \tag{97}$$

где d — линейное поле зрения микроскопа; A — апертура объектива; $A_{кол}$ — апертура коллектора. Расчеты показывают, что в микроскопах минимальный размер светящегося тела обычно равен 2—2.5 мм.

4. Срок службы. Стремление иметь источники с возможно бо́льшим сроком службы не требует особых пояснений.

Об импульсных источниках света сообщается в гл. X.

Лампы накаливания

Светящееся тело лампы накаливания представляет собой тонкую ленту или спираль из тонкой проволоки. Для микроскопов выбирают лампы с плотно навитой спиралью, т. е. такой, у которой промежутки между витками малы. Это дает высокую габаритную яркость и обеспечивает более равномерное освещение поля зрения. Материалом для тела накала служит вольфрам. Вольфрам имеет меньшую яркость по сравнению с абсолютно черным телом при той же температуре, а максимум излучения вольфрама приходится на меньшую длину волны, чем у черного тела, т. е. цвет излучения первого менее красен, чем второго. При некоторых определенных температурах черное тело будет иметь такую же яркость или цветность, как вольфрам при данной температуре. Эти температуры черного тела называют соответственно яркостной и цветовой температурой вольфрама. Например, вольфрамовый излучатель при температуре 2800° К имеет такую же яркость, как черное тело с температурой 2516° К, и цветность, соответствующую цветности черного тела с температурой 2878° К.

Газополные лампы и лампы с иодным циклом позволяют доводить тело накала до более высоких температур и тем самым получать бóльшую яркость, чем пустотные лампы.

Излучение ламп накаливания имеет максимум в более длинноволновой области спектра по сравнению с дневным светом от солнца или неба (т. е. цвет ламп более красный), как это показано на рис. 44, где относительное спектральное распределение энергии в излучении ламп накаливания представлено в виде предельных кривых. За единицу энергии для всех кривых на рисунке принята энергия излучения при $\lambda=555$ нм, соответствующей максимальной спектральной чувствительности глаза. Лампы дают излучение также в ближних ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра. Таким образом, диапазон излучения ламп накаливания простирается от 0.36 до 1.2 мкм.

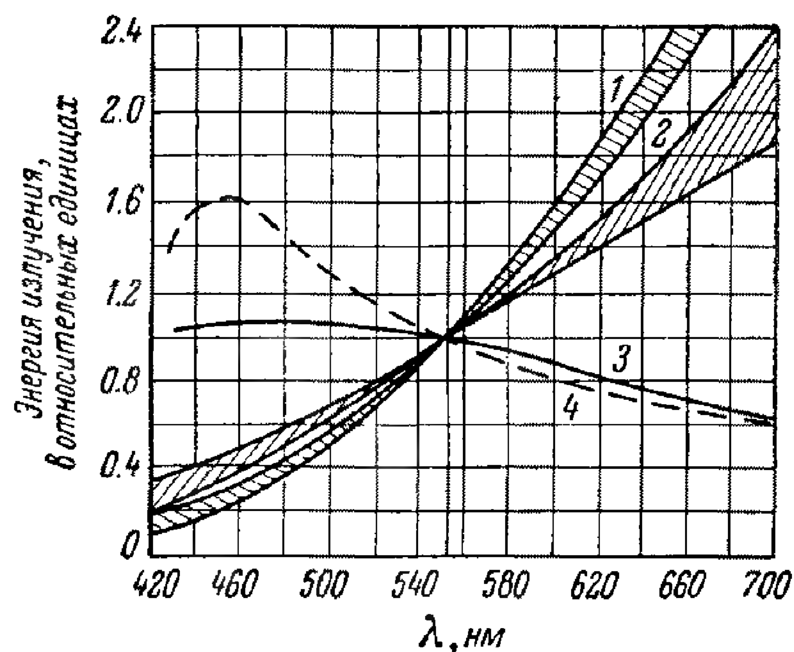


Рис. 44. Спектральное распределение энергии в излучении некоторых источников.

1 — пустотная вольфрамовая лампа; 2 — газополная вольфрамовая лампа; 3 — солнце; 4 — голубое небо.

Световые, электрические и конструктивные характеристики ламп накаливания, применяемых в микроскопах, приведены в табл. 3, а общий вид ламп—на рис. 45. Все эти лампы, кроме лампы КИМ9-75, имеют стандартные цоколи.

Световые и электрические параметры ламп накаливания взаимозависимы, и изменение одного из них вызывает соответствующее изменение других. Наибольший практический интерес представляет зависимость светового потока (а следовательно, и яркости), срока службы и мощности лампы от изменения напряжения сети питания. Характер этих зависимостей показан на рис. 46.

Вопрос о количественной оценке перечисленных зависимостей возникает в микрофотографии при желании получить более яркий источник. В этом случае лампа работает при повышенном напряжении с перекалом.

Следует иметь в виду, что с изменением напряжения цветность излучения не остается неизменной, т. е. световой поток меняется неодинаково для различных длин волн. Относительное изменение светового потока Φ_λ связано с относительным изменением напряжения соотношением

$$\frac{\Delta\Phi_\lambda}{\Phi_\lambda}=\frac{\Delta U}{U}\cdot\frac{5.5}{\lambda T}, \tag{98}$$

где λ — длина волны в мкм; T — температура в °К. Формула справедлива для диапазона температур от 2000 до 3655° К и диапазона длин волн от 0.2 до 0.7 мкм.

С изменением напряжения электрической сети меняется также и цветовая температура спирали лампы. С точностью, достаточной для практических целей, можно считать, что изменение это в пределах отклонения напряжения на ±30% от номинального значения происходит по линейному закону. Для приведенных в таблице ламп (кроме ламп Си) изменению напряжения на 1% соответствует изменение цветовой температуры приблизительно на 11° К.

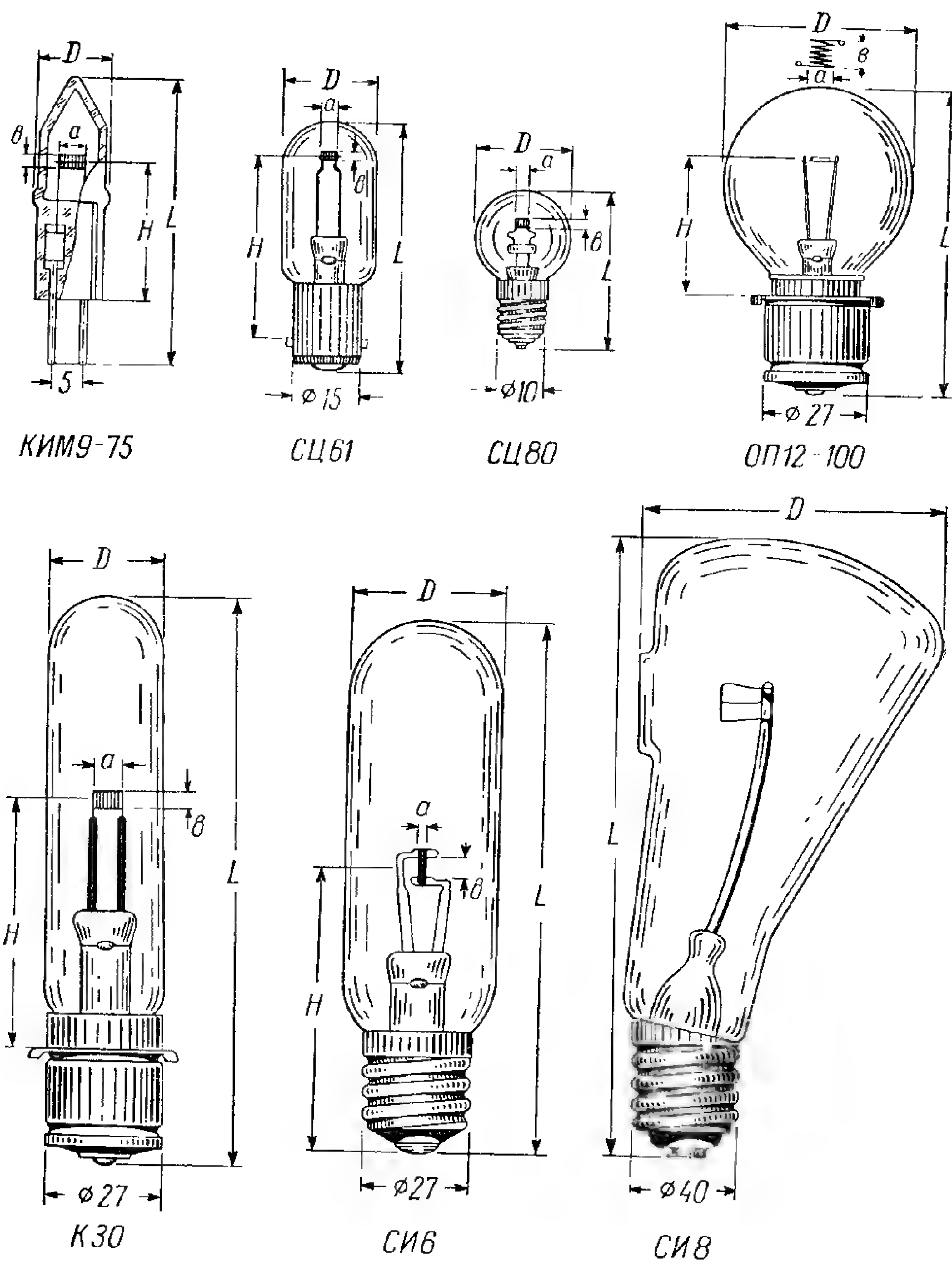


Рис. 45. Внешний вид ламп накаливания.

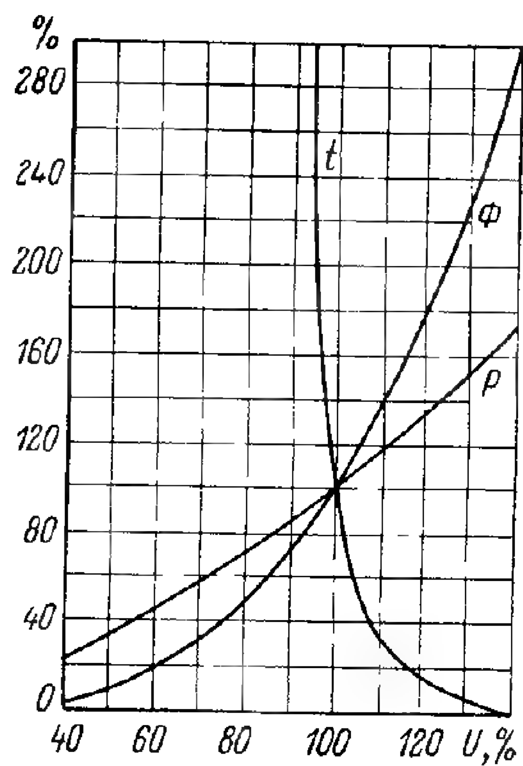


Рис. 46. Зависимость мощности (P), светового потока (Φ) и срока службы (t) ламп накаливания от изменения напряжения сети питания.

ТАБЛИЦА 3

Основные электрические, световые параметры и размеры ламп накаливания

Тип лампы	Напряжение, в	Мощность, вт	Световой поток, лм	Габаритная яркость,* Мнт	Цветовая температура, °К	Диаметр колбы наибольший D, мм	Длина лампы наибольшая L, мм	Высота светового центра H, мм	Ширина светящегося тела наибольшая a, мм	Высота светящегося тела наибольшая b, мм	Средний срок службы, час.	Тип цоколя	Положение при горении
СЦ61	8	20	250	6.5	2850	21	56	42	2.8	2	100	2Ш15-1	Любое
КИМ9-75	9	75	—	14.9	3250	12	45	23	2.6	2.6	50	—	Вертикальное
К30	17	170	4420	29.5	3300	27	155	60	6.5	4.3	20	1Ф-С34-1	Вертикальное цоколем вниз
ОП12-100	12	100	2500	17.6	3200	51	88	35	5.5	2.5	25	1Ф-С34-1	Любое
СЦ80	8	9	84	3.1	—	18	33	Не нормируется	1.7	1.7	50	РЮ-2	»
Си6-100	6	100	Не нормируется	8.7	—	45	155	75 ±3	2.1	8.5	200	Р27/32	Вертикальное
Си8-200	8	200	То же	9.6	—	85	110	110	2.1	10.5	300	Р40/45-1	»

* Яркость ленточной лампы Си6-100 определена, исходя из температуры тела накала, яркости остальных ламп измерены относительно яркости лампы Си6-100.

ТАБЛИЦА 4

Основные электрические, световые параметры и размеры некоторых газоразрядных ламп

Тип лампы	Минимальное напряжение питания, в	Напряжение на лампе, в	Мощность, вт	Рабочий ток, а	Световой поток, лм	Яркость в центре разряда, Мнт	Диаметр колбы наибольший D, мм	Длина лампы наибольшая L, мм	Расстояние между электродами, мм	Срок службы, час.	Размеры светящегося тела (приближенно), мм	Положение при горении
ДРШ-100-2	=60—120	20	100	5	—	1000	12	85	1	100	0.3×0.3	Вертикальное
ДРШ-250	~127	72	250	4.5	12500	100	25.5	145	3.9	250	1.5×3	»
СВД-120А	220	125	120	1.2	4200		97	140	30	250	2×30	Любое
ДКсШ-130	=150	23	130	5.5	2000	50	27	135	2	100	—	Вертикальное
ДКсШ-200	=70	22	200	—	—	90	26	149	2—2.5	500	—	»

Газоразрядные лампы

Газоразрядные лампы отличаются от ламп накаливания двумя особенностями: во-первых, они имеют значительно более высокий энергетический к.п.д., что позволяет получать бо́льшую яркость при той же мощности; во-вторых, в отличие от теплового излучения твердых тел, имеющего непре-

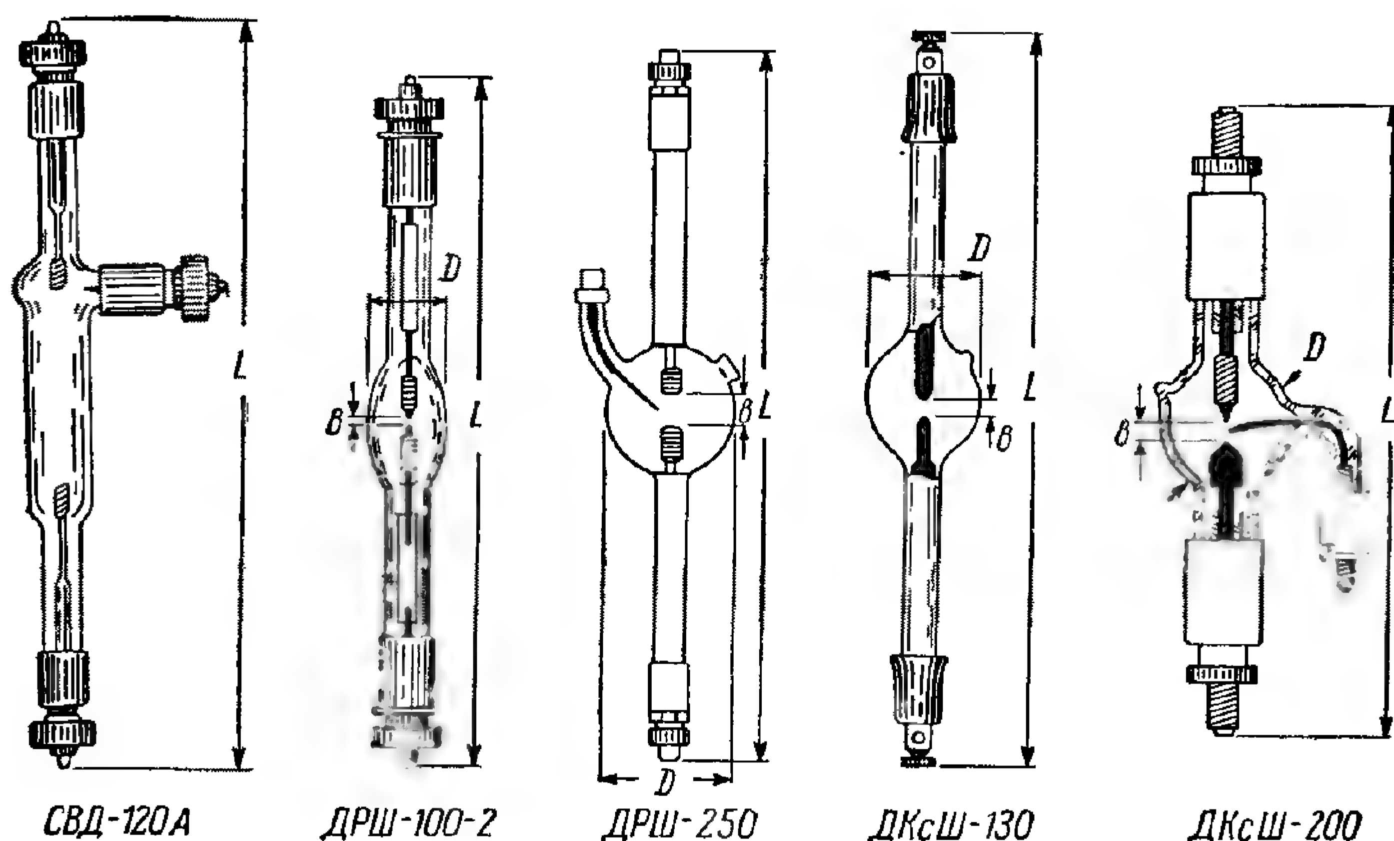


Рис. 47. Внешний вид ртутно-кварцевых и ксеноновых ламп сверхвысокого давления.

рывный спектр, газовый разряд дает обычно излучение преимущественно с линейчатым спектром, характерным для того газа или пара, в котором происходит разряд. Отдельные виды газового разряда могут давать излучение с непрерывным спектром.

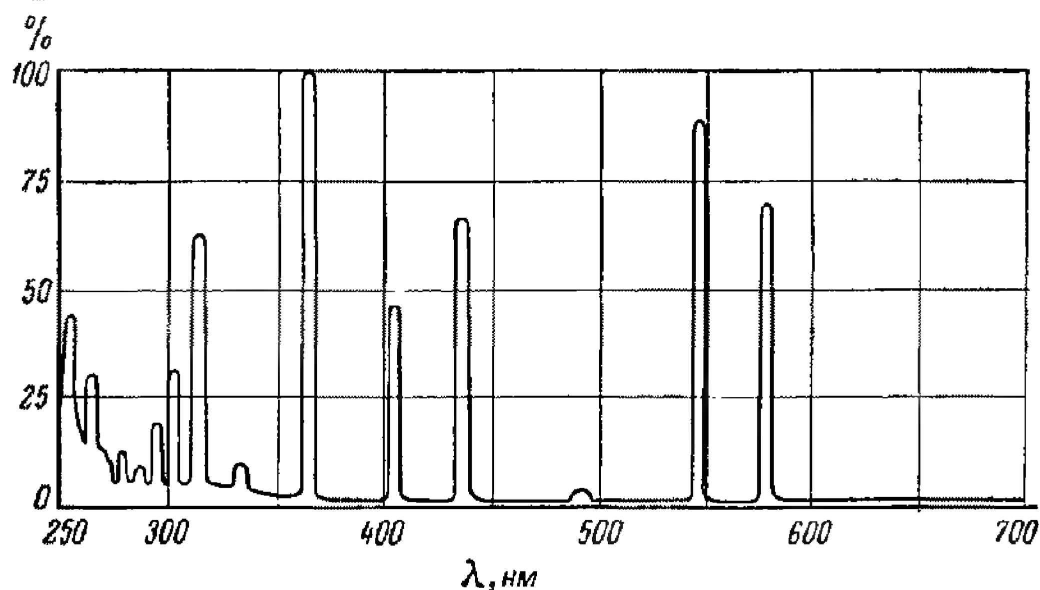


Рис. 48. Распределение энергии в спектре излучения ртутно-кварцевой лампы СВД-120А.

В микроскопах применяются ртутно-кварцевые и ксеноновые лампы сверхвысокого давления, основные характеристики которых приведены в табл. 4, а общий вид на рис. 47. Оба вида этих ламп имеют очень высокую яркость. Энергия излучения ртутных ламп преимущественно сосредоточена в ультрафиолетовой и сине-фиолетовой областях спектра, а ксеноновых — в видимой и инфракрасной областях.

На рис. 48 приведена кривая распределения энергии в спектре излучения ртутно-кварцевой лампы СВД-120А. В спектре имеется слабый непре-

рывный фон. В лампах ДРШ давление в несколько раз выше, чем в лампе СВД-120А, и достигает десятков атмосфер. Поэтому их спектр хотя и линейчатый, но имеет сильно выраженный непрерывный фон. Спектральные линии значительно расширены. В табл. 5 приводятся яркости ртутно-квар-

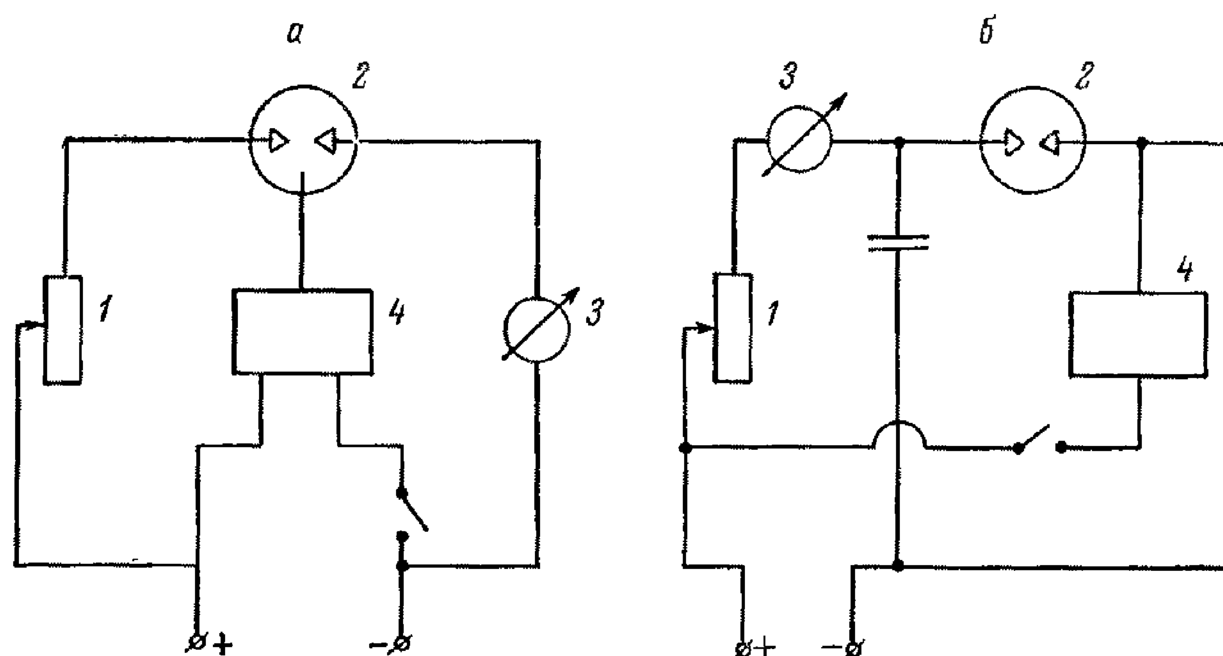


Рис. 49. Принципиальная схема включения ламп ДРШ и ДКсШ в электрическую цепь постоянного тока.

а — для трехэлектродной лампы; *б* — для двухэлектродной лампы.

цевых ламп для различных длин волн в единицах яркости лампы ПРК-4 (т. е. яркости последней приняты за единицу). В первой строке таблицы указаны энергетические освещенности, создаваемые лампой ПРК-4 на площадке, отстоящей от нее на расстоянии 1 м. Время разгорания ламп составляет от 2 до 5 мин.

Ртутные лампы включаются в электрическую сеть только последовательно с балластным сопротивлением, ограничивающим силу тока в цепи. При работе на постоянном токе сопротивлением служит реостат, а при переменном токе — дроссель. Зажигание ламп типа ДРШ осуществляется с помощью кратковременного импульса высокого напряжения и высокой частоты, подаваемого на зажигающий электрод лампы или на один из рабочих электродов, если зажигающего не имеется. Для получения такого импульса служит высокочастотный преобразователь с трансформатором. Принципиальная схема включения и зажигания лампы ДРШ показана на рис. 49.

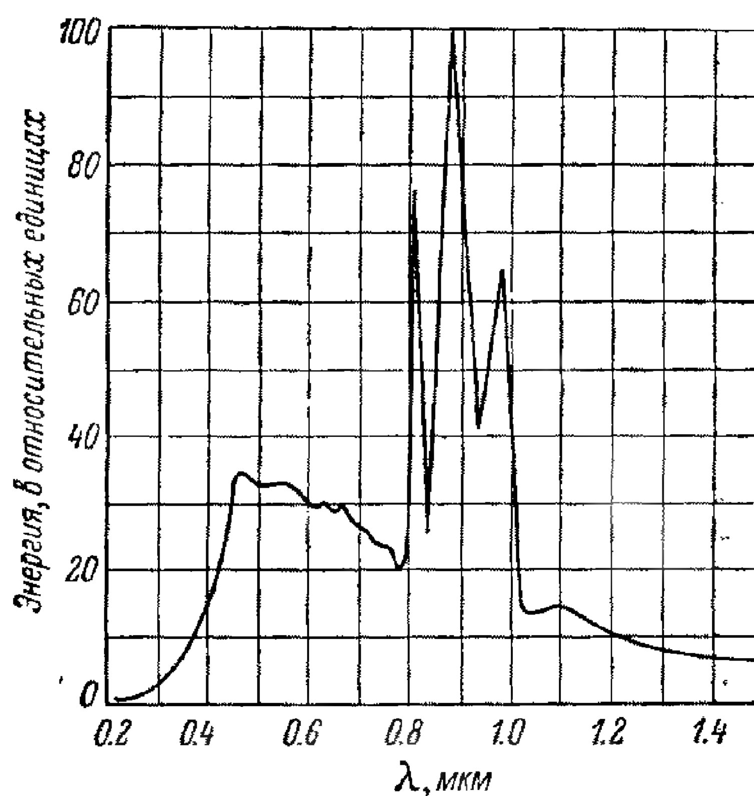


Рис. 50. Распределение энергии в спектре излучения ксеноновой лампы типа ДКсШ.

Так как давление в ртутно-кварцевых лампах достигает нескольких десятков атмосфер, а температура колбы доходит до 950° С, то при работе лампа должна быть надежно закрыта кожухом. Кроме того, кожух должен предохранять глаза обслуживающего персонала от попадания прямого или рассеянного излучения, богатого ультрафиолетовыми лучами, которые вредны для глаз.

В отличие от ртутных ламп, газовый разряд в ксеноновых лампах сверхвысокого давления дает излучение с непрерывным спектром (рис. 50),

ТАБЛИЦА 5

Энергетическая освещенность от лампы ПРК-4 и относительные яркости ртутно-кварцевых ламп

Параметр	Тип лампы	Длина волны, нм													
		248	254	265	270	275	280	289	297	303	313	334	365	405	436
Энергетическая освещенность на расстоянии 1 м, мквт/см²	ПРК-4	7.2	18	16.2	2.9	2.2	7.1	3.5	10	22.5	47.7	4.6	70.2	25.2	43.2
Относительная яркость	ПРК-4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	СВД-120А при токе 1.2 а	2.3	2.0	2.2	2.7	3.0	2.0	2.2	2.4	2.2	2.1	2.8	2.5	2.9	2.7
	СВД-120А при токе 2.0 а	4.7	4.2	3.9	5.3	6.0	4.4	4.4	4.5	4.1	3.9	5.4	4.6	5.0	5.0
	ДРШ-100-2	70	0	5	30	75	40	130	55	40	30	120	45	120	90
	ДРШ-250	16	0	0	0	0	0.5	8	17	15	16	90	30	80	60

причем длины волн интенсивных линий в ближней инфракрасной области спектра определяются ксеноном. Цветовые температуры ксеноновых ламп для излучения в видимой области спектра имеют значения приблизительно от 5500 до 6000° К. Давление в лампах достигает нескольких десятков атмосфер. Ксеноновые лампы включаются в сеть и зажигаются аналогично ртутным лампам сверхвысокого давления.

4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОСКОПЫ

Биологические микроскопы—наиболее распространенная группа приборов как по количеству моделей, так и по массовости их выпуска. Десятки фирм выпускают сотни различных типов биологических микроскопов, отличающихся друг от друга конструкцией и оснащением объективами, окулярами и принадлежностями. Микроскопы этой группы предназначены для применения в биологических, медицинских, химических, физических и других лабораториях.

Сравнительно простые модели биологических микроскопов предназначены для исследования прозрачных окрашенных препаратов в проходящем свете по методу светлого поля. Они комплектуются минимальным набором (три-четыре) ахроматических объективов и окуляров. Микроскопы снабжаются конденсором и моно- или бинокулярным тубусом. Освещение препарата производится от постороннего источника. Фокусировка микроскопа чаще всего осуществляется путем перемещения тубусодержателя. Микроскоп типа МБР (рис. 40) может служить примером такой простой модели.

Микроскоп ЕС фирмы Олимпус характерен следующими тремя конструктивными особенностями (рис. 51). Во-первых, под конденсором вместо зеркала может быть установлен осветитель, обеспечивающий освещение по Кёлеру. Во-вторых, окуляры в бинокулярном тубусе расположены под некоторым углом друг к другу, что улучшает условия наблюдения.

В-третьих, механизм грубой фокусировки имеет регулируемый ограничитель величины перемещения. Ограничитель облегчает работу на приборе при массовом исследовании препаратов одинаковой толщины, так как дает возможность, меняя препарат, возвращать механизм фокусировки в одно и то же исходное положение.

Оригинальный механизм фокусировки микроскопа «Лаборлюкс» (рис. 52) в некоторых случаях предоставляет определенные удобства работы. Фокусировка здесь производится путем перемещения предметного столика. Для грубого и точного движения служит одна и та же рукоятка. Двухкоординатный столик имеет опущенные вниз коаксиально расположенные рукоятки управления. Хотя в основание прибора встроен осветитель, однако освещение по Кёлеру не обеспечивается. Тринокулярный тубус дает возможность переходить без смены узлов от наблюдения объекта к его фотографированию. Микроскоп комплектуется набором планахроматических объективов и окуляров, обеспечивающих диапазон увеличений в пределах полезного для апертур до 1.25.

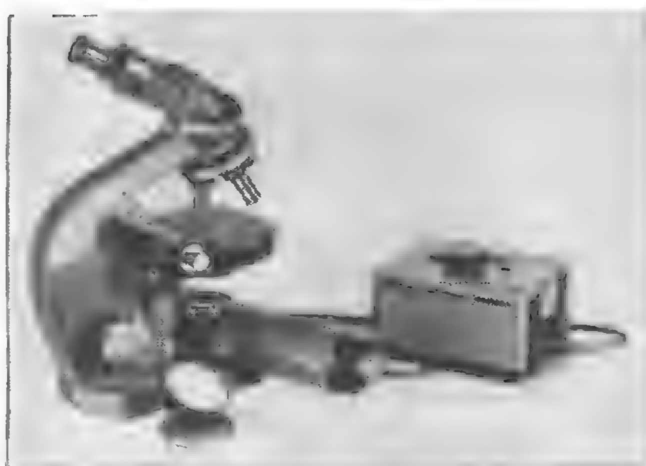


Рис. 51. Биологический микроскоп ЕС фирмы Олимпус.



Рис. 52. Микроскоп «Лаборлюкс» фирмы Э. Лейтц.

Для исследовательских работ рекомендуют, например, биологический микроскоп МББ-1А, позволяющий проводить наблюдения в проходящем свете по методам светлого и темного поля или применяя метод фазового контраста. Микроскоп (рис. 53) имеет неподвижный тубусодержатель. Фокусировка производится перемещением предметного столика. Встроенный осветитель с лампой мощностью 20 вт обеспечивает возможность настройки освещения по Кёлеру. Бинокулярный тубус прибора снабжен сменными линзовыми системами для получения трех ступеней увеличения при одном и том же объективе и окуляре. Кроме того, имеется четвертая, вспомогательная, система, с помощью которой можно наблюдать выходной зрачок объектива. Она особенно необходима для настройки освещения методами темного поля или фазового контраста. Хорошее качество изображения достигается применением апохроматических обективов. Для работы по методу фазового контраста используются ахроматические объективы. Апертуры объективов лежат в пределах от 0.1 до 1.30, а максимальное увеличение микроскопа превышает 2000×.

Одной из последних разработок фирмы К. Цейсс, Иена является микроскоп «Амплывал» (рис. 54), снабженный встроенным осветителем с низко-

вольтной лампой накаливания, универсальным конденсором и бинокулярным тубусом. Последний по желанию можно заменить тубусом с панкратической системой для плавного изменения увеличения. Микроскоп комп-



Рис. 53. Большой биологический микроскоп МББ-IA фирмы ЛОМО.



Рис. 54. Микроскоп «Ампливал» фирмы К. Цейсс, Иена.

лектуется ахроматическими, апохроматическими или планобъективами. Механизм фокусировки имеет ограничитель передвижения.

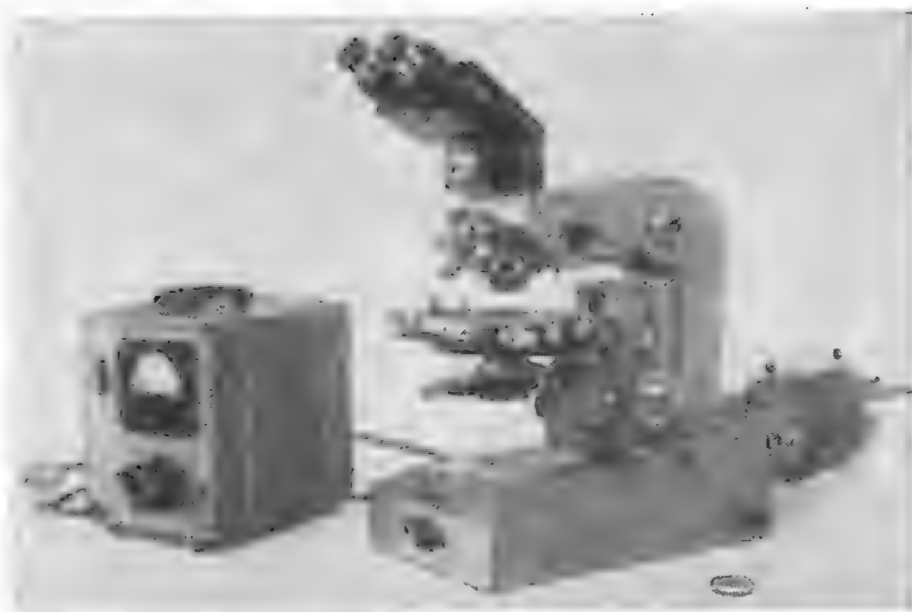


Рис. 55. Исследовательский биологический микроскоп МБИ-II фирмы ЛОМО.

Исследования не только прозрачных, но и непрозрачных объектов могут проводиться на микроскопе МБИ-11 (рис. 55), конструкция которого позволяет применять методы светлого (как прямое, так и косое освещение) и темного поля, а также метод фазового контраста. Микроскоп имеет жест-

кий штатив и встроенный осветитель с лампой мощностью 100 вт. Это делает его весьма подходящим для фотографических работ. Оптическая система для освещения проходящим светом смонтирована в основании прибора, а для отраженного света — в тубусодержателе. Двухкоординатный предметный столик может поворачиваться вокруг вертикальной оси и центрироваться относительно объектива. Бинокулярный тубус имеет сменные линзовые системы для изменения увеличения микроскопа. Они дают совместно с объективами и окулярами увеличения микроскопа от 70 до 2380×. Для работы в проходящем свете применяются апохроматические объективы, а в отраженном — ахроматические эпиобъективы.

5. СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОСКОПЫ

Флуоресцентные микроскопы служат главным образом для исследования объектов в свете их флуоресценции, но могут применяться также для работы по методу светлого поля. Хотя наибольшее распространение микроскопы этого типа получили для биологических

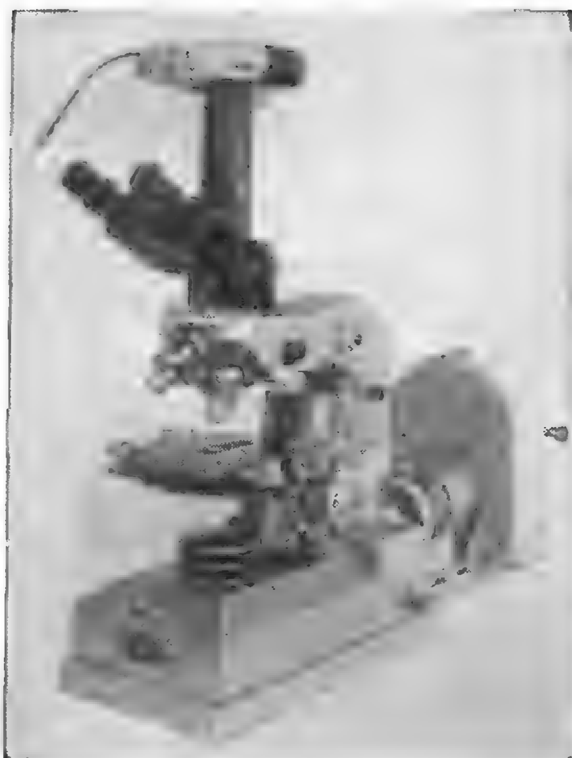


Рис. 56. Люминесцентный микроскоп МЛ-2Б фирмы ЛОМО.



Рис. 57. Микроскоп «Ортоплан» фирмы Э. Лейтц с осветителем для наблюдения флуоресценции и фотокамерой.

исследований, они используются также в области минералогии, физики, химии.

Принципиальная оптическая схема флуоресцентного микроскопа МЛ-2Б аналогична схеме рис. 37. Для возбуждения флуоресценции препарат можно освещать как снизу — через конденсор, так и сверху — через объектив. Кроме того, возможно комбинированное освещение. Источником света служит ртутная лампа сверхвысокого давления ДРШ-250, которая имеет интенсивное излучение в сине-фиолетовой и ближней ультрафиолетовой областях спектра. Вся осветительная система смонтирована в основании и тубусодержателе прибора. Обычные и фазовоконтрастные

ахроматические объективы и окуляры обеспечивают необходимый диапазон увеличений прибора и его разрешающую способность. Внешний вид микроскопа МЛ-2Б показан на рис. 56.

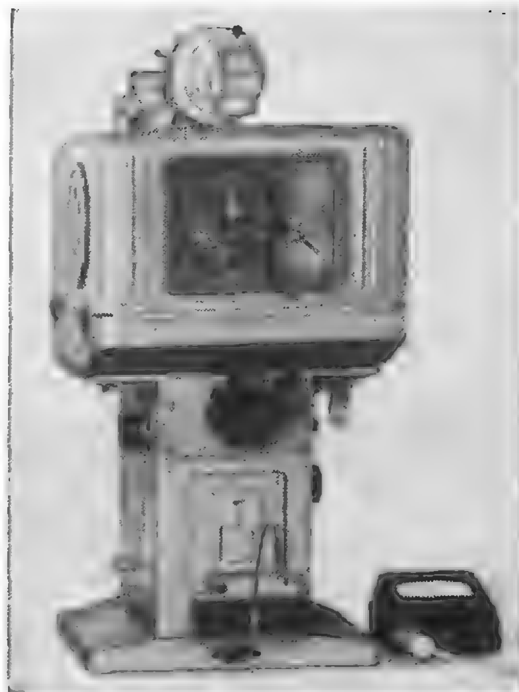


Рис. 58. Инвертированный биологический микроскоп МБИ-12 фирмы ЛОМО.

Флуоресцентные микроскопы многих фирм представляют собой комбинацию биологических микроскопов обычного типа и устройств, необходимых для наблюдения флуоресценции (т. е. осветителей, светофильтров и др.). Примером такого прибора может служить микроскоп «Ортоплан», укомплектованный осветителем с ксеноновой лампой 450 вт (рис. 57). Планобъективы микроскопа рассчитаны на большое поле зрения, превышающее по размерам обычное поле в полтора раза. Кроме ксеноновой лампы, в осветителе имеется обычная лампа накаливания. Если первая служит для возбуждения флуоресценции, то вторая применяется для наблюдения по методу фазового контраста. Массивный штатив прибора имеет достаточную жесткость для того, чтобы закрепить на нем вертикальную пластиночную фотокамеру.

Инвертированные биологические микроскопы предназначаются для изучения культур тканей, колоний бактерий и других живых объектов, находящихся в питательной среде в специальных кюветах. Принципиально конструкция этих микроскопов отличается от обычных тем, что у них предметный столик расположен над объективом.

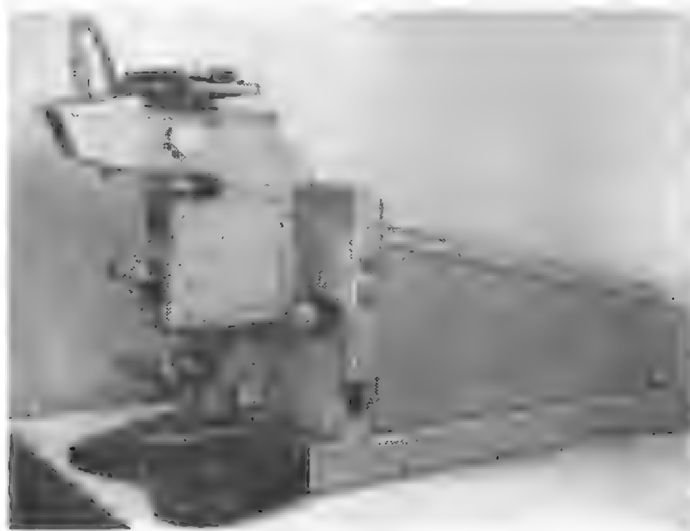


Рис. 59. Ультрафиолетовый микроскоп МУФ-6 фирмы ЛОМО.

В инвертированном микроскопе МБИ-12 ввиду специфики исследуемых объектов предусмотрена возможность не только фотографирования, но и киносъемки увеличенных изображений. Микроскоп (рис. 58) снабжен термостатирующей камерой, в которой размещены конденсор, предметный столик и револьвер с объективами. Остальные узлы прибора расположены вне камеры. Лампа мощностью 100 вт создает достаточную освещенность объекта. Его наблюдение производится в проходящем естественном или поляризованном свете по методам светлого и темного поля и фазового контраста. Термостатирующая камера поддерживает любую заданную температуру в пределах 25—42° С. Так как в микроскопе нельзя применять иммерсионные объективы, то наибольшая апертура здесь составляет 0.85, а увеличение микроскопа не превышает 900×.

Ультрафиолетовый микроскоп МУФ-6 — прибор для изучения биологических объектов в невидимой коротковолновой области спектра до длины волны $\lambda = 250$ нм, но может применяться также для работы в видимом свете. Микроскоп (рис. 59) снабжен двумя источниками света (ртутно-кварцевой и ленточной лампами) и монохроматором. Препарат освещается снизу через конденсор или сверху через объектив. Наблюдение производится с помощью электронно-оптического преобразователя. Для фотографирования служит пластиночная трехпольная камера. Она позволяет применять метод цветовой трансформации, о котором подробней сообщается в гл. VI. Во время съемки одновременно с изображением препарата на негативе впечатывается фотометрический клин. Это дает возможность применить затем фотометрирование изображения и перейти, таким образом, к количественным измерениям. Увеличение микроскопа при фотографировании в проходящем ультрафиолетовом свете достигает 1000$^{\times}$, а в свете ультрафиолетовой флуоресценции — 375$^{\times}$. В последнем случае увеличение сравнительно невелико, так как ультрафиолетовая флуоресценция имеет незначительный энергетический выход.

6. ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЕ МИКРОСКОПЫ

Поляризационные микроскопы служат для изучения объектов, обладающих оптической анизотропией. Микроскопы используются при исследовании горных пород, минералов, огнеупоров, текстильных материалов, биологических препаратов и т. д. Разнообразные модели многочисленных фирм отличаются друг от друга конструкцией и комплектом оптики и



Рис. 60. Поляризационный микроскоп «Полядун IVM» фирмы Ратенов.



Рис. 61. Исследовательский поляризационный микроскоп МИН-8 фирмы ЛОМО.

принадлежностей. Все поляризационные микроскопы имеют следующие характерные особенности: вращающийся предметный столик с лимбом для измерения углов поворота, устройство для центрирования объектива или предметного столика, приспособление для коноскопического наблюдения, поворотные поляризатор и анализатор, оптические элементы, свободные от внутренних натяжений.

Простые поляризационные микроскопы предназначены для исследования только в проходящем свете и изготовляются на небольших штативах. Они снабжаются небольшим набором объективов и окуляров и имеют сравнительно грубые шкалы для отсчета углов поворота поляризатора, анализатора и предметного столика. Коноскопирование в этих микроскопах производится с помощью точечной диафрагмы, устанавливаемой вместо окуляра.

Более сложные модели поляризационных микроскопов могут быть применены для исследований как в проходящем, так и в отраженном свете. Для этого они имеют постоянный или съемный опак-иллюминатор. Таким прибором является, например, микроскоп «Полядун-IVM». Прибор (рис. 60) снабжен навесным осветителем, который закрепляется на кронштейне предметного столика (при работе в проходящем свете) или на корпусе несъемного опак-иллюминатора (при работе в отраженном свете). Ахроматические объективы с увеличениями от 6.3 до 63× устанавливаются на приборе с помощью специальных центрируемых салазок. Микроскоп имеет наклоняемый штатив, благодаря чему можно установить тубус прибора под любым углом между горизонтальной и вертикальной плоскостями. Уместно сказать, что с наклоняемыми штативами существуют также и биологические микроскопы. Такие приборы незаменимы, например, при фотографировании объектов, которые должны располагаться вертикально или под определенным углом к горизонту.



Рис. 62. Поляризационный микроскоп WL POl фирмы Оптон.

Поляризационный микроскоп МИН-8 фирмы ЛОМО предназначен для работы в исследовательских лабораториях. Микроскоп (рис. 61) имеет жесткий тубусодержатель и встроенный осветитель с лампой мощностью 20 вт. Фокусировка осуществляется перемещением предметного столика. Микромеханизм снабжен двумя рукоятками и имеет следующую особенность: вращением одной из рукояток производится обычное точное перемещение столика; при одновременном повороте обеих рукояток в одну сторону движение убыстряется, при вращении в разные стороны — замедляется. Для центрировки объективов служит шлицевое устройство. В тубусе микроскопа смонтированы ирисовая диафрагма для выделения коноскопируемого зерна и линза Бертрана. Механизм линзы позволяет центрировать ее и производить фокусировку на выходной зрачок объектива. В головке тубусодержателя размещен револьвер с интерференционными светофильтрами, с помощью которых можно производить наблюдение в монохроматическом свете. Обычные и планахроматические объективы с апертурами от 0.1 до 1.25 совместно с окулярами обеспечивают общее увеличение микроскопа от 17.5 до 1350×.

Поляризационный микроскоп «WL Pol». Фирмы Оптон[1] имеет, как и любой другой прибор, свои особенности (рис. 62). Механизм фокусировки

[1] Фирма Оптон иногда именует себя также К. Цейсс, Оберкохен.

с коаксиально расположенными рукоятками для грубого и точного перемещения снабжен стопорным устройством, исключающим движение после окончания фокусировки. В конструкции предметного столика предусмотрены две дополнительные возможности: фиксация столика через каждые 45° поворота и замедленное вращение с помощью вспомогательного винта. Планахроматические объективы устанавливаются в револьвере и центрируются с помощью эксцентриковых оправ.

7. МЕТАЛЛОГРАФИЧЕСКИЕ МИКРОСКОПЫ

Металлографические микроскопы предназначены для исследования непрозрачных объектов, главным образом шлифов металлов, в отраженном свете.

Если не говорить об упрощенных металлмикроскопах, то все остальные приборы этой группы снабжены фотокамерами того или иного вида. Такое обстоятельство обусловлено тем, что фотография — одно из основных средств исследования шлифов металлов. Благодаря специфике объектов, подлежащих наблюдению на приборе, большинство металлографических

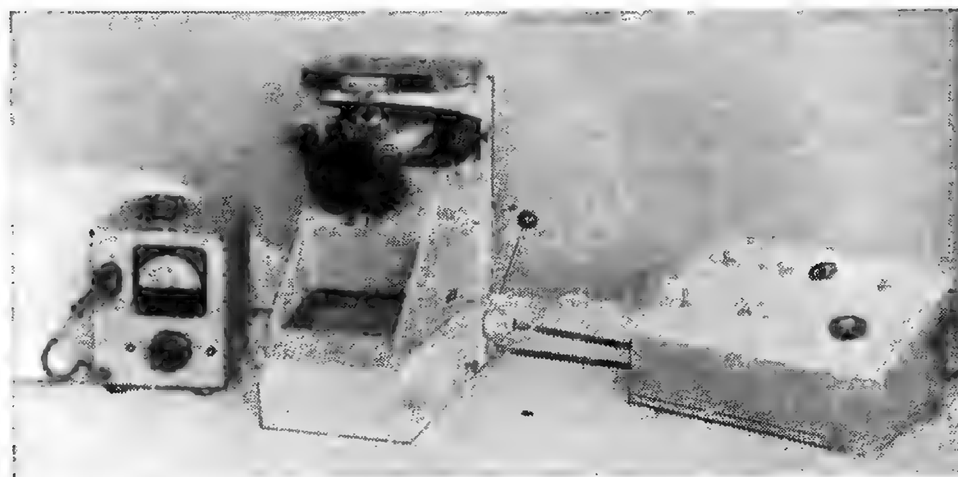


Рис. 63. Рабочий металлографический микроскоп ММР-2 фирмы ЛОМО.

микроскопов почти всех фирм выполняется по типу микроскопа Ле Шателье — прибора, у которого объектив расположен под предметным столиком. Сведения о некоторых микроскопах с объективом, расположенным над столиком, можно почерпнуть в следующем параграфе. Все металлмикроскопы снабжены встроенными осветителями, хотя возможность освещения по Кёлеру не всегда предусмотрена.

Рабочий металлографический микроскоп ММР-2 имеет две особенности, отличающие его от других приборов этого класса (рис. 63): 1) его предметный столик может автоматически перемещаться в горизонтальной плоскости, что значительно облегчает последовательный просмотр всей поверхности объекта; 2) ниже бинокулярного тубуса расположен экран, на котором можно наблюдать изображение объекта. Камера для пластинок размером 9×12 см или пленочная фотокамера устанавливаются на левой стороне прибора. Лампа мощностью 100 вт создает освещенность, достаточную для фотографирования. Набор объективов и окуляров обеспечивает, в частности, 5 стандартных ступеней общего увеличения микроскопа в пределах от 100 до 1000×. Наблюдения объектов производятся по методам светлого и темного поля, а также в поляризованном свете.

Выбор того или иного способа наблюдения обусловлен не только спецификой объекта, но теми методиками, которые приняты в исследованиях. Например, в микроскопе PMF (рис. 64) вместо метода темного поля используется метод фазового контраста. Система прибора рассчитана так, что с обычными объективами можно получить как позитивный, так и негативный фазовый контраст разной силы. Удобство работы на приборе обеспечивается сравнительно небольшими его размерами и легкостью поворота вокруг вертикальной оси. Последнее необходимо при переходе от визуального наблюдения к фотографированию, которое осуществляется с помощью микрофотонасадки обычного типа.

Исследования по методам светлого и темного поля, фазового и интерференционного контраста, в поляризованном свете — вот те возможности,



Рис. 64. Металлографический микроскоп PMF фирмы Олимпус.



Рис. 65. Универсальный металлографический микроскоп МИМ-9 фирмы ЛОМО.

которые предоставляет универсальный металлографический микроскоп МИМ-9 (рис. 65). Два источника света (лампа накаливания мощностью 100 вт и ксеноновая лампа) во всех случаях обеспечивают необходимую освещенность. Изображение объекта рассматривается через бинокулярный тубус или на демонстрационном экране. Фотографирование можно производить на пластинки размером 9×12 и 13×18 см или посредством пленочной камеры. Необходимое время экспозиции отрабатывается автоматически с помощью экспонометрической системы. Набор планахроматических объективов и окуляров позволяет изменять общее увеличение микроскопа при фотографировании от 20 до $2000^{\times}$, включая ступени стандартных увеличений.

Микроскоп MeF (рис. 66) предназначен в первую очередь для исследования непрозрачных объектов в отраженном свете. Наблюдения могут производиться по методам светлого и темного поля, фазового и интерференционного контраста и в поляризованном свете. В конструкции прибора предусмотрена возможность установки над предметным столиком осветительного устройства с конденсором. Это позволяет проводить исследование прозрачных объектов в проходящем свете. Конструкция микроскопа выполнена таким образом, что замена или установка каких-либо принадлежностей не представляет особого труда. Такими принадлежностями являются устройство для измерения микротвердости, приспособле-

ние для позитивного и негативного фазового контраста, высокотемпературная вакуумная камера, интерференционное приспособление для измерения микрорельефа, флуоресцентное устройство и др. Пластиночная фотокамера

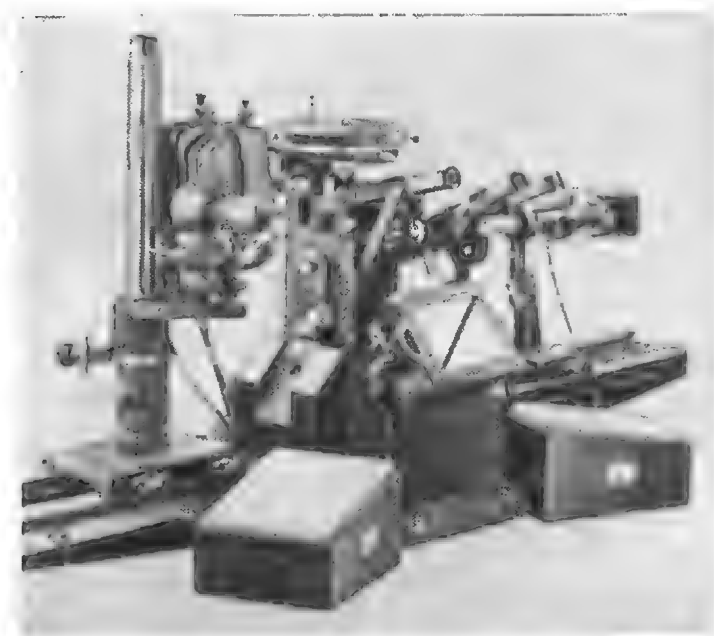


Рис. 66. Универсальный микроскоп MeF фирмы К. Рейхерт.

встроена в корпус прибора, тогда как пленочная устанавливается с помощью дополнительного тубуса рядом. Различные объективы, в том числе ахроматические, совместно с оптической системой прибора дают общее увеличение прибора на фотопластинке от 50 до 2000$^{\times}$. Освещение объекта на микроскопе можно производить с помощью лампы накаливания, ксеноновой, ртутной, циркониевой и других ламп.

8. УНИВЕРСАЛЬНЫЕ МИКРОСКОПЫ И ФОТОМИКРОСКОПЫ

В этом параграфе сообщается о лучших моделях универсальных и фотомикроскопов, выпускаемых различными фирмами. Трудно провести границу между этими двумя типами приборов, но можно считать, что фотомикроскопы отличаются наличием устройств для фотографирования.

Универсальные микроскопы предназначаются для исследования как прозрачных, так и непрозрачных объектов всеми широко применяемыми в настоящее время методами. В некоторых приборах, кроме того, предусмотрена возможность применения таких методов, которые сравнительно редко встречаются в практике (например, измерение микротвердости и др.).

Микроскопы «Ортолюкс» и «Цетопан» (рис. 67 и 68) имеют жесткие массивные штативы и встроенные осветители с лампами накаливания. Первый из этих приборов снабжен двумя независимыми осветителями для работы в проходящем и отраженном свете, во втором для обоих случаев применяется один и тот же осветитель. По мере необходимости (исследование в темном поле, в свете флуоресценции и т. д.) можно использовать и другие источники света, например ксеноновые и ртутные лампы.

Для перехода от одного метода исследования к другому требуется смена тех или иных узлов, закрепляемых на штативе прибора: предметных столиков, конденсоров, револьверов с объективами или опак-иллюминаторов, тубусов. Например, на рис. 67 показан микроскоп «Орто-

люкс», оснащенный комплектом для наблюдения непрозрачных объектов по методу фазового контраста, а на рис. 87 можно видеть тот же микроскоп, приспособленный для работы в проходящем поляризованном свете. На рис. 68 представлен вариант микроскопа «Цетопан» для исследования биологических прозрачных объектов. Оба микроскопа оснащены объек-

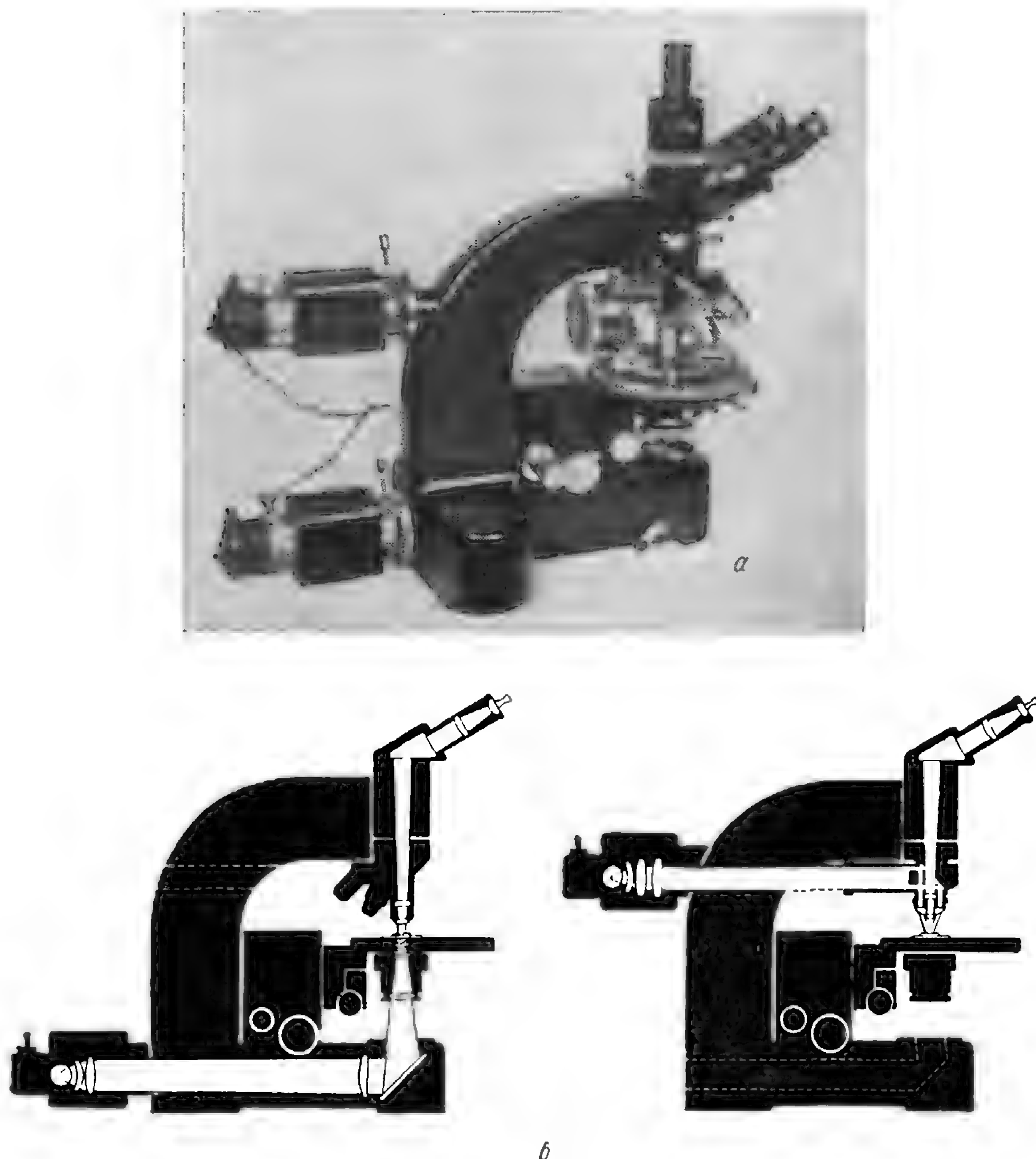


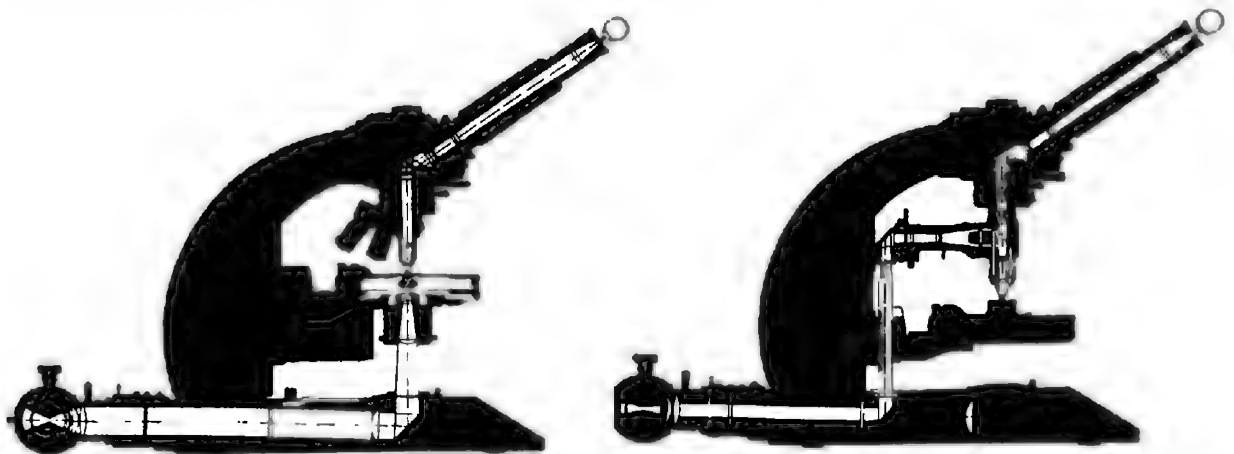
Рис. 67. Большой исследовательский микроскоп «Ортолюкс» фирмы Э. Лейтц.
а — внешний вид прибора; *б* — схематический разрез.

тивами с плоским полем изображения. Для целей фотографирования в микроскопе «Ортолюкс» предусмотрен тринокуляр, а в микроскопе «Цетопан» — фототубус. Микрофотонасадка обычного типа устанавливается на вертикальном прямом тубусе. При этом некоторое удобство работы на микроскопе «Цетопан» обеспечивается тем, что бинокулярный тубус может быть повернут в сторону так, чтобы не мешать наблюдению через визир фотонасадки.

В отношении микрофотографии два следующих прибора занимают промежуточное положение между универсальными и фотомикроскопами. Микроскоп Nu снабжается таким комплектом принадлежностей, который

обеспечивает возможность исследования большинством существующих методов. На рис. 69 показан микроскоп с комплектом узлов для работы в проходящем поляризованном свете. Микроскоп имеет три осветителя (с лампой накаливания, ксеноновой и ртутной лампами), сменные конденсоры и предметные столики, взаимозаменяемые опак-иллюминатор, револьвер и щипцевое устройство для объективов, сменные тубусы. Удобству наблюдения на приборе способствует панкратическая система для плавного изменения увеличения в четыре раза. При микрофотографировании действие этой системы аналогично изменению длины камеры. Система построена таким образом, что если изображения препарата и сетки, имеющейся в приборе, видны в бинокулярном тубусе одновременно резкими, то изображение на фотопластинке также будет резким. В случае выключенной панкратической системы (что бывает необходимо при исследованиях в свете флуоресценции, в поляризованном свете) необходимо применять микрофотонасадку обычного типа. В конструкции микро-





б

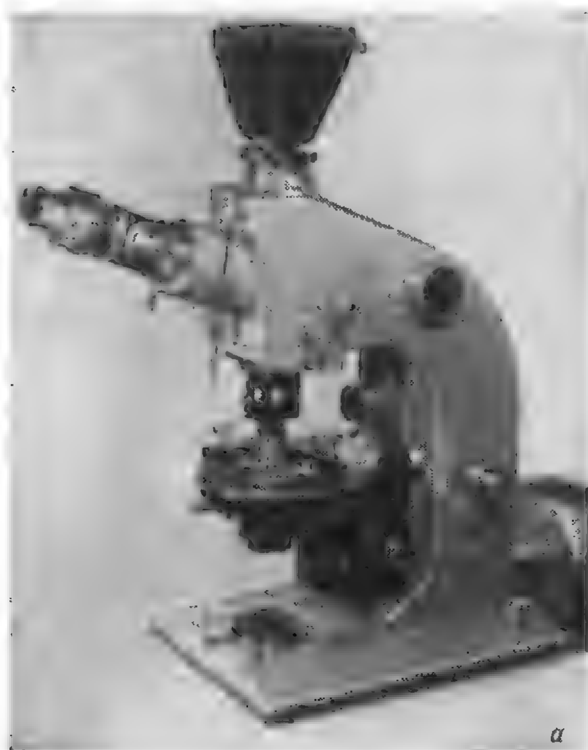
Рис. 68. Большой исследовательский микроскоп «Цетопан» фирмы К. Рейхерт.
а — внешний вид прибора; *б* — схематический разрез.

скопа предусмотрена возможность подключения фотоэлемента для определения необходимого времени экспозиции.

Исследование прозрачных и непрозрачных биологических объектов в светлом и темном поле, в поляризованном свете, методами фазового и интерференционного контраста, в свете флуоресценции — вот те возможности, которые предоставляет экспериментатору микроскоп МБИ-15. Конструкция микроскопа (рис. 70) выполнена таким образом, что вся оптическая система смонтирована в корпусе прибора, поэтому переход от одного метода исследования к другому производится путем переклю-

чения соответствующих рукояток. Микроскоп имеет три источника света: лампу накаливания, ртутную и импульсную лампы. Последняя особенно полезна при фотографировании живых объектов. Широкий диапазон увеличения прибора обеспечивается оптической системой совместно с окулярами и большим набором объективов: ахроматических, планапохроматических и эпиобъективов. При фотографировании пользуются камерой для пластинок 9×12 см и пленочной камерой. Процесс съемки значительно облегчается благодаря наличию устройства для автоматической отработки времени экспозиции, которое может меняться в пределах от долей секунды до десятков минут.

Микроскопы «Ультрафот II» и «Фотомикроскоп» — приборы, у которых фотокамера составляет как бы органическую часть всей конструкции.



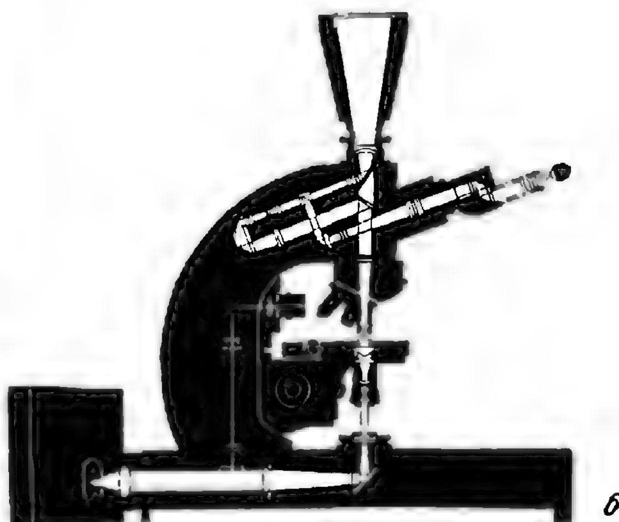


Рис. 69. Большой универсальный исследовательский микроскоп Nu фирмы К. Цейсс, Иена.

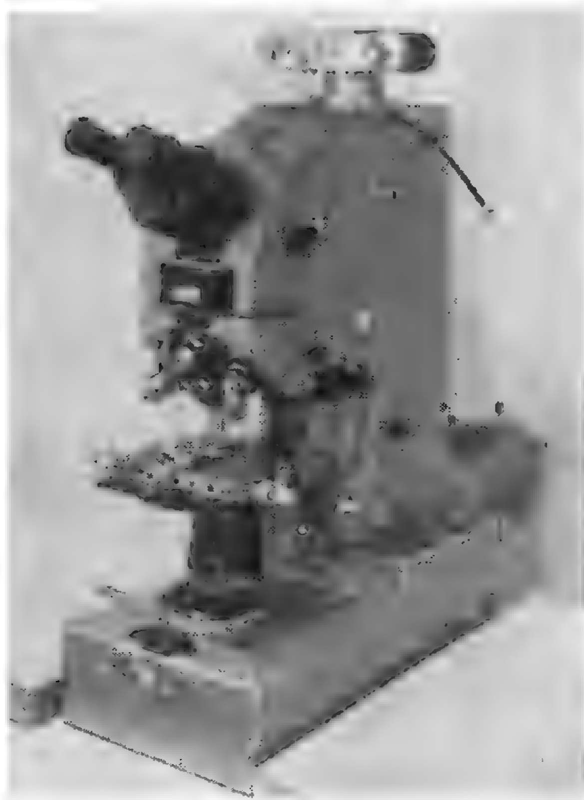
а — внешний вид прибора; *б* — схематический разрез.

Первый из них (рис. 71) предназначен для съемок на пластинки размером 9×12 см, второй (рис. 72) — для съемок на 35-миллиметровую пленку. Оба прибора снабжены автоматическим фотоэкспонометром, который производит требуемую выдержку при данной освещенности. Микроскопы могут комплектоваться большими наборами различных объективов: планахроматическими, планапохроматическими и эпиплан. В зависимости от установленных на приборе сменных узлов он может быть приспособлен для исследований различными методами прозрачных и непрозрачных объектов. Так, на рис. 71*а* показан микроскоп для работы в проходящем свете, а на рис. 72*а* —вариант поляризационного микроскопа.

Если на «Фотомикроскопе» устанавливается один из сменных осветителей, то на микроскопе «Ультрафот II» закреплены сразу три осветителя с различными источниками. Это позволяет быстро выбрать оптимальные условия работы.

Оптическая система микроскопа «Ультрафот II» собрана в одном съемном блоке и содержит следующие элементы: объективы, сменные линзы для получения трех ступеней увеличения, переключающиеся призмы для перераспределения света между визуальным тубусом и фотокамерой, линзовая система для проекции изображения и, наконец, бинокулярный или монокулярный тубус. В корпусе прибора размещена подвижная ка-

ретка с зеркалами, с помощью которых изменяют длину камеры и тем самым плавно изменяют масштаб изображения на пластинке.



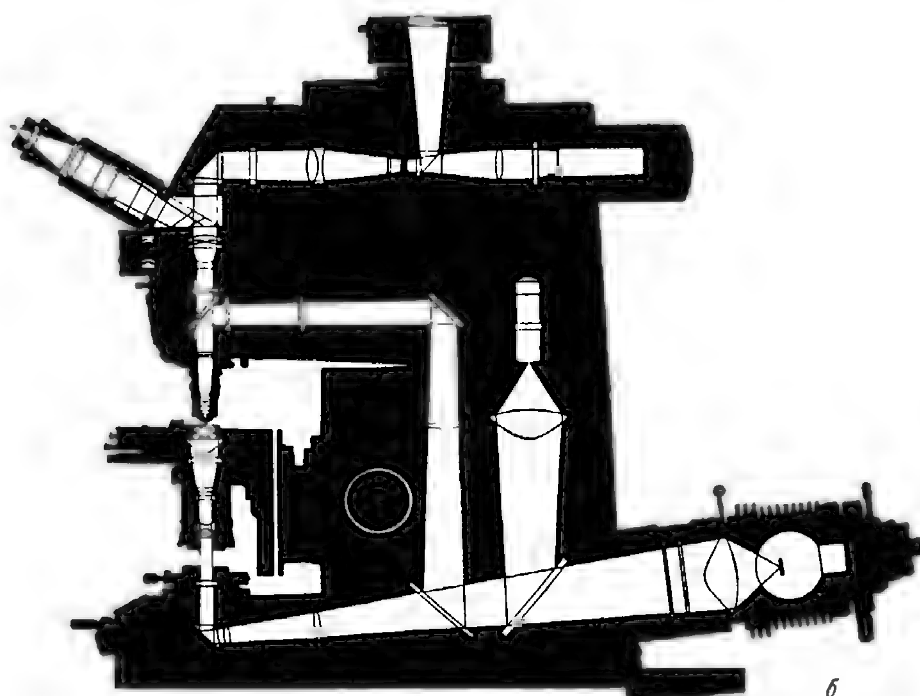
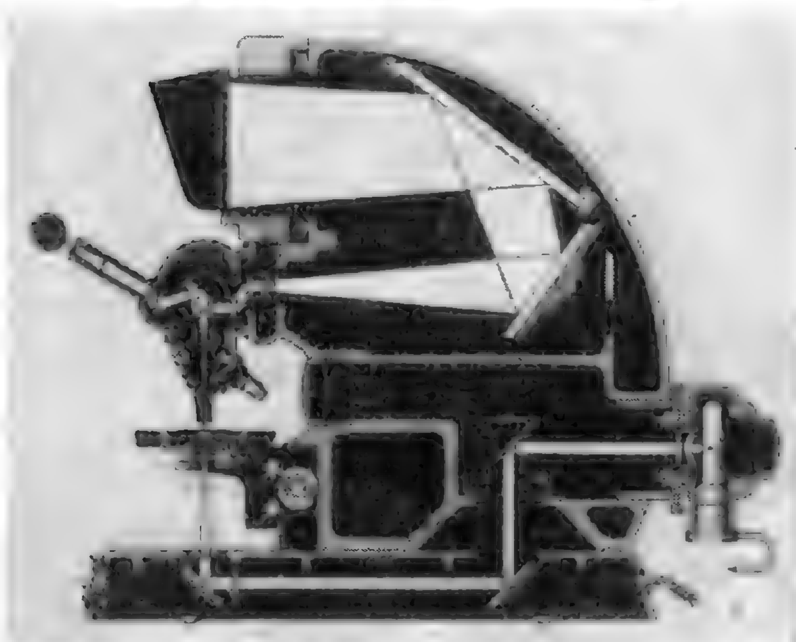


Рис. 70. Универсальный биологический микроскоп МБИ-15 фирмы ЛОМО.

а — внешний вид прибора; *б* — схематический разрез.

Оптическая система «Фотомикроскопа» несколько сложнее. Здесь длина камеры не меняется. Специальный барабан с пленкой устанавливается в средней части корпуса прибора. Фокусирование на резкое изображение производится при наблюдении в бинокулярный тубус прибора.





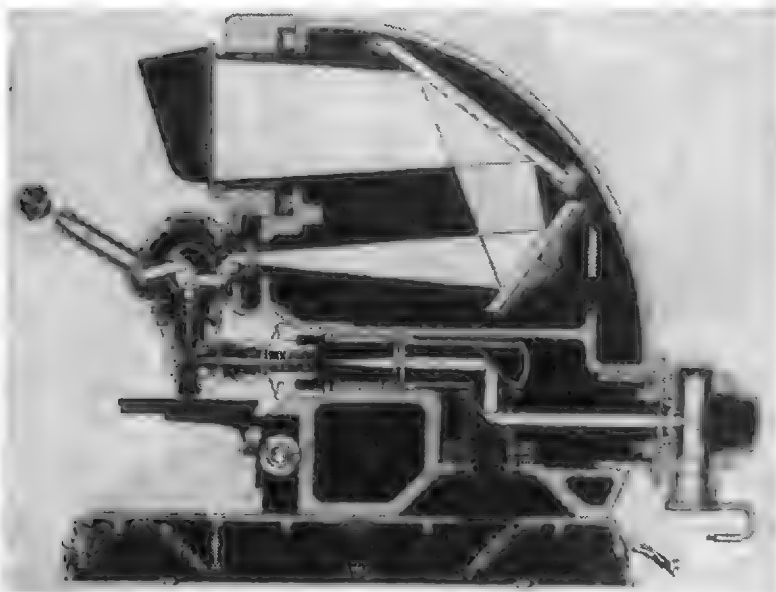


Рис. 71. Микроскоп «Ультрафот II» фирмы Оптон.
а — внешний вид прибора; *б* — схематический разрез.



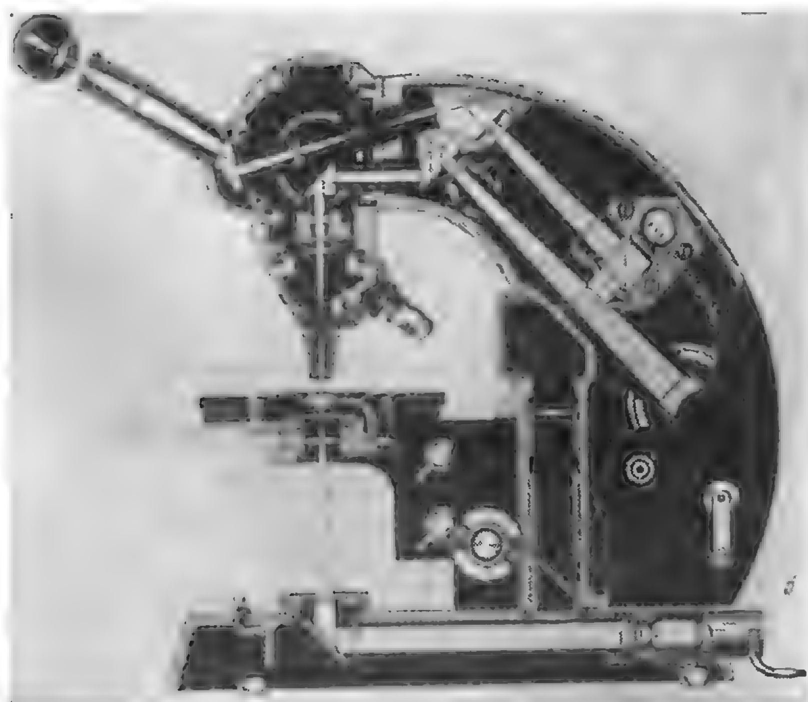


Рис. 72. «Фотомикроскоп» фирмы Оптон.
а — внешний вид прибора; *б* — схематический разрез.

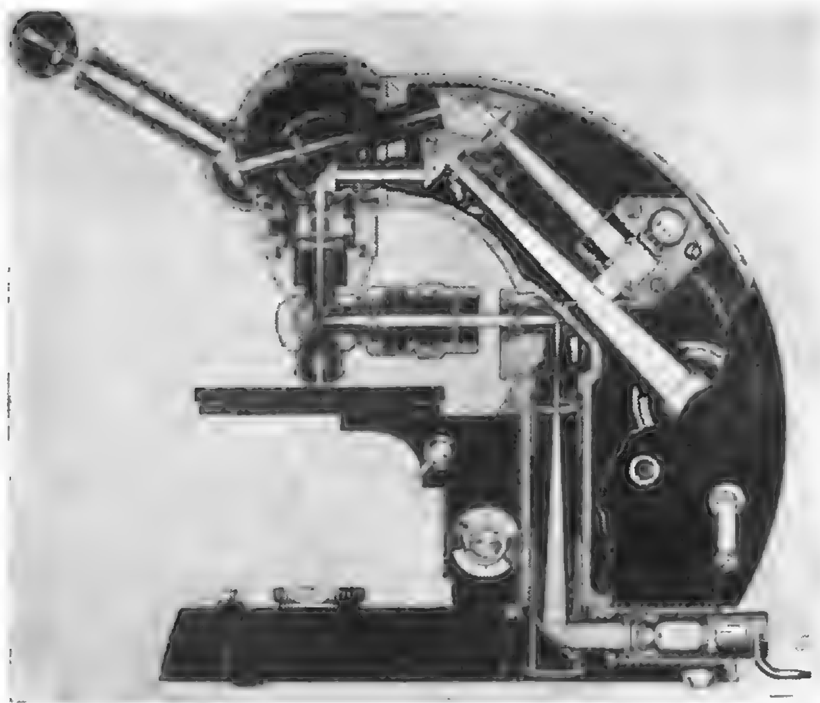


Рис. 72 *(продолжение)*.



Рис. 73. Большой фотомикроскоп «Панфот» фирмы Э. Лейтц.

Микроскоп «Панфот» фирмы Э. Лейтц также является универсальным фотомикроскопом (рис. 73), но конструкция его не такая закрытая, как у предыдущих приборов. Поэтому его можно легко приспособить, например, для целей макрофотографирования.

9. МИКРОФОТОНАСАДКИ

Микрофотонасадки — наиболее простые и самые распространенные устройства, позволяющие производить фотографирование через микроскоп. Основными элементами фотонасадки (рис. 74) являются: устройство для контроля резкости изображения на фотоэмульсионном слое *1—3*, корпус с призмой *4* и фотокамера *5* с затвором.

Устройство для контроля резкости изображения на фотослое конструируют преимущественно в виде визирной трубки, состоящей из объек-

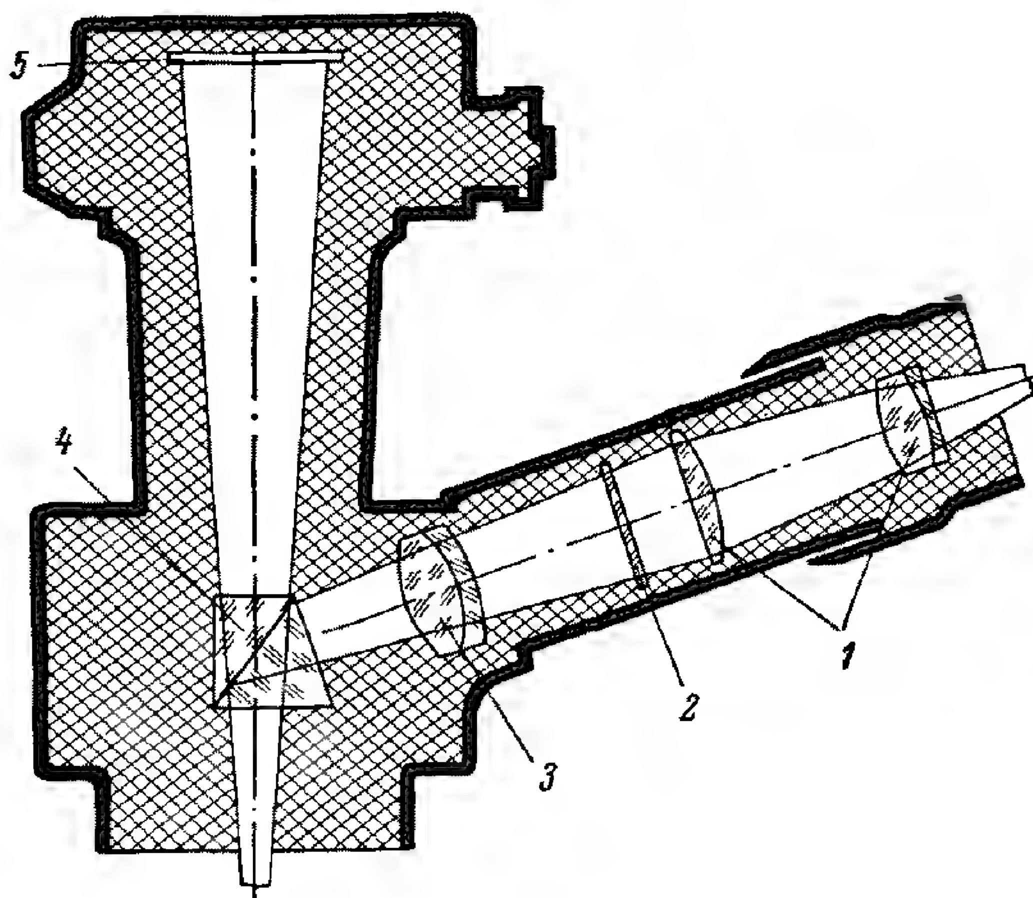


Рис. 74. Схематическая конструкция микрофотонасадки МФН-12.

тива *3*, сетки *2* и окуляра *1*. Объектив выполняет вспомогательную роль и уменьшает расстояние между окуляром микроскопа и сеткой. Сетка располагается в плоскости, оптически сопряженной со слоем фотоэмульсии, и представляет собой стеклянную пластинку с нанесенной на нее прямоугольной рамкой. Размер рамки соответствует размеру кадра. В центре рамки имеются перекрестие или биштрихи, облегчающие фокусирование на сетку при наблюдении. Сетка помещена вблизи фокальной плоскости окуляра, снабженного механизмом для диоптрийной установки. Таким образом, если одновременно резкими видны сетка и изображение объекта, то последнее будет резким и на фотослое. Иногда визирную трубку заменяют небольшим экраном из матового стекла, сопряженным с фотослоем.

Светоделительная призма фотонасадки осуществляет последовательное или одновременное распределение светового потока между фотокамерой и визирной трубкой. В первом случае она подвижная: если призма на оси оптической системы, свет направляется в визирную трубку; если выведена — свет проходит непосредственно к фотокамере. Во втором случае, которому соответствует схема рис. 74, призма имеет светоделительное покрытие, направляющее часть излучения в трубку, часть в фотокамеру.

Преимущество микрофотонасадки с выключающейся призмой заключается в том, что весь световой поток направляется либо в визирный тубус, либо в фотокамеру. Это имеет существенное значение при малых освещенностях изображения. Недостатки такой насадки — исключается наблюдение за препаратом во время экспозиции и усложнены конструкция устройства или процесс работы. Для насадки со светоделительной призмой преимущество и недостатки меняются местами.

Существуют насадки третьего типа, в которых установлены переключающиеся призмы, обеспечивающие возможность как последовательного, так и одновременного распределения светового потока между визирной трубкой и фотокамерой.

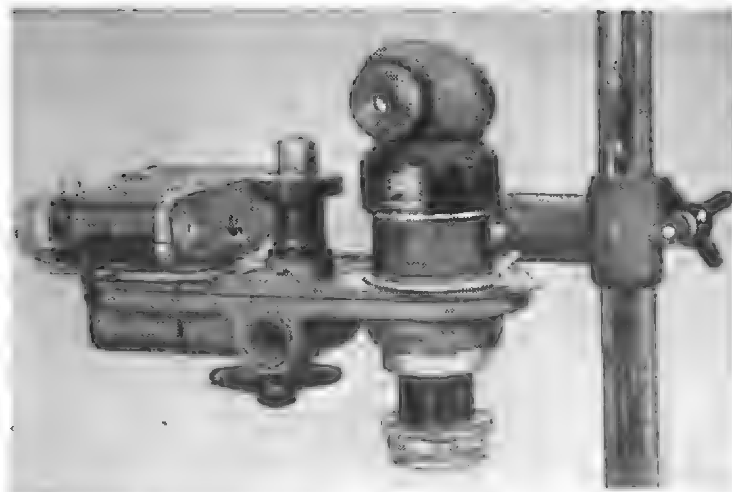


Рис. 75. Устройство для микрофотографирования фирмы Цейсс-Икон.

Встречаются насадки, оптическая схема которых отличается от описанной, но принцип действия всех устройств остается одним и тем же. Для примера можно сослаться на оригинальное устройство для фотографирования фирмы Цейсс-Икон (рис. 75). В ней визирная трубка и фотокамера смонтированы на поворотной плате, так, что они поочередно устанавливаются над тубусом микроскопа. Все насадки снабжены затвором для осуществления экспозиции.

Фотокамера *5* (рис. 74) может быть пластиночной или пленочной.

Многообразие типов микрофотонасадок представлено на рис. 76, где приведены наиболее распространенные элементы насадок. Комбинация тех или иных элементов дает насадку определенного типа.

Если микроскоп (рис. 67) не имеет фототубуса, то на приборе устанавливается вертикальный тубус *21* [1] или тринокуляр *22*. В последнем имеется светоделительная призма и приспособление для фокусировки.

Простейшая насадка состоит из камеры с матовым экраном для фокусировки, установленной на вертикальном тубусе или фототубусе. Например, насадка из элементов *6* и *12* показана на рис. 77, а камера *7*, закрепленная на микроскопе, представлена на рис. 56. Интересно отметить, что в первой из них между объективом и фотопленкой отсутствует какая-либо оптика. Такие устройства встречаются редко, чаще применяют насадку из элементов *6*, *12*, *19*, *21* или *8*, *13*, *19*, *21*.

Сравнительно мало распространены также фотонасадки с проекционным экраном *15* для фокусировки. Изображение на экране представляется

---

[1] Все ссылки на номера элементов приборов, показанных на рисунках 52, 56, 67, 68, 77—82, 89, 98 относятся к рис. 76.

по сравнению с изображением в визирной трубке более подобным тому, какое получается на фотопластинке. Однако для работы с экраном требуются значительно более яркие источники света, чем в случае визирной трубки. Насадка такого типа показана на рис. 78 (элементы *8*, *15*, *16*, *19*, *21*).

Комбинированная фотонасадка (элементы *11*, *14*, *15*, *16*) фирмы Э. Лейтц (рис. 79) даст возможность производить фокусировку как с по-

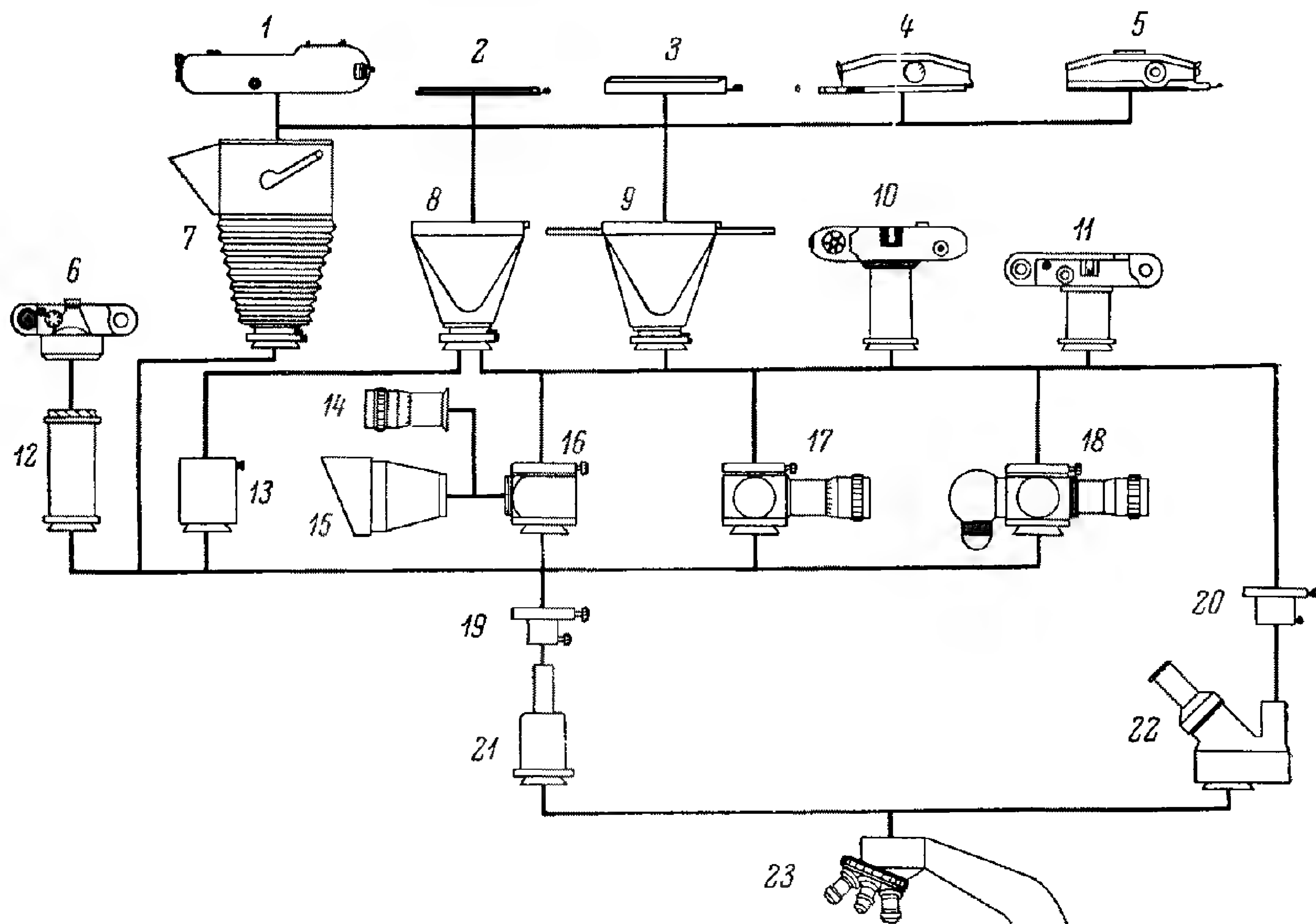


Рис. 76. Схема возможных комбинаций элементов микрофотонасадок.

1 — кассета камеры Ленда; *2* — кассета для пластинок; *3* — кассета для форматных пленок; *4* — кассета для 35-мм пленки; *5* — кассета для широкоформатной пленки; *6* — зеркальная малоформатная камера; *7* — пластиночная камера переменной длины; *8* — камера для пластинок 6×9 или 9×12 см; *9* — пластиночная камера с адаптором для съемки нескольких кадров; *10* — широкоформатная пленочная камера 6×6 см; *11* — малоформатная пленочная камера 24×36 мм; *12* и *13* — переходные детали для камер; *14* — визирная трубка для фокусировки; *15* — проекционный экран для фокусировки; *16* — корпус фотонасадки; *17* — корпус фотонасадки с приспособлением для измерения времени экспозиции; *18* — корпус фотонасадки с автоматическим экспонометром; *19* и *20* — переходные детали для крепления элементов; *21* — вертикальный тубус с окуляром; *22* — тринокуляр; *23* — тубусодержатель микроскопа.

мощью визирной трубки, так и по матовому стеклу. Насадку той же фирмы, состоящую из элементов *11*, *14*, *16*, можно видеть на рис. 52 вместе с микроскопом. По рисункам можно судить о том, что в насадках использованы любительские малоформатные пленочные фотокамеры (монтируются они без объектива). Аналогичные насадки выпускает большинство фирм.

На рис. 80, *а* показан внешний вид микрофотонасадки МФН-12 фирмы ЛОМО, где применен аппарат «Зоркий» без объектива. Насадка состоит из элементов *11*, *14*, *16*, *21* и имеет неподвижную светораспределительную призму. Собственное увеличение насадки при проекции изображения на пленку составляет около 0.5×. Широкоформатной пленкой можно пользоваться при работе с фотонасадкой МФН-9, в которой также использован любительский аппарат (рис. 80, *б*). Размер кадра 6×6 см. Аналогичная фотонасадка (элементы *10*, *14*, *16*) для съемки на широкоформатную пленку была показана вместе с микроскопом на рис. 68.

Камера 8 может быть двух типов: для получения негативов размером 6×9 или 9×12 см. Микрофотонасадки МФН-7 и МФН-8 (рис. 80, *в*, *г*) предназначены для съемок на пластинки с кассетой *2*, которая устанавливается на камере.

Возможности камеры *8* значительно расширяются при использовании

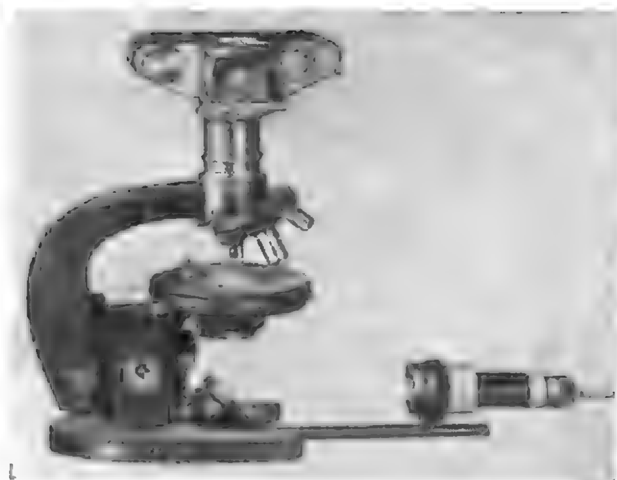


Рис. 77. Микрофотонасадка, состоящая из зеркальной камеры, на микроскопе фирмы К. Цейсс, Иена.



Рис. 78. Микрофотонасадка с проекционным экраном фирмы К. Цейсс, Иена.

различных кассет. Так, кассета *1*, подобная устройству «Поляроид-Ленд», позволяет получать одновременно с негативом готовый позитивный отпечаток (см. гл. IV). Такое устройство демонстрируется на рис. 89.



Рис. 79. Микрофотонасадка фирмы Э. Лейтц.

Для работы с форматной пленкой служит кассета *3*. Большие удобства предоставляют кассеты для широкоформатной 6-сантиметровой пленки *5* и для 35-миллиметровой пленки *4*. При них фотонасадка становится подобна насадкам с камерами *10* и *11*. Для примера на рис. 81 показан микроскоп М20 с тринокуляром и фотонасадкой, состоящей из камеры *8* и кассеты *4*.

Тринокуляр *22* создает в работе определенный комфорт, так как позволяет производить наблюдение одновременно двумя глазами. Для целей фокусировки на резкое изображение в одном из окуляров расположена сетка, оптически сопряженная с плоскостью фотоэмульсионного слоя. Таким тринокуляром снабжена микрофотонасадка МФН-11 с пленочной камерой «Зоркий» (рис. 82). В корпусе насадки под бинокулярным тубусом смонтированы неподвижная призма со светоделительным слоем и револьвер с четырьмя сменными линзовыми системами. Три из этих систем предназначены для изменения общего увеличения микроскопа, четвертая—для наблюдения выходного зрачка объектива. Последнее очень полезно при настройке освещения.

Более совершенные фотонасадки снабжаются устройствами, позволяющими определять правильное время экспозиции. Устройство состоит

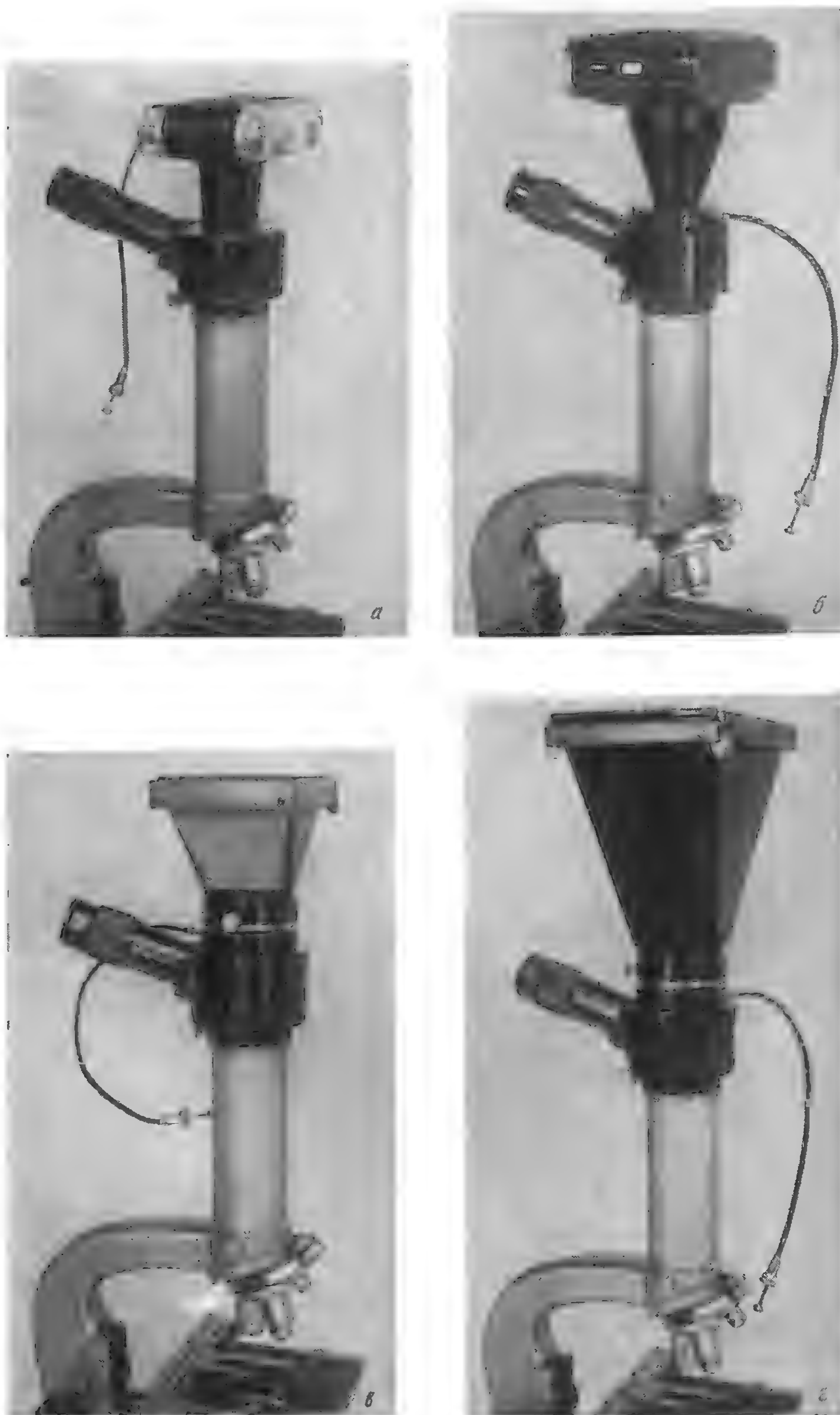


Рис. 80. Микрофотонасадки фирмы ЛОМО.

а — пленочная МФН-12; *б* — пленочная МФН-9; *в* — камера МФН-7 для пластинок 6×9 см; *г* — камера МФН-8 для пластинок 9×12 см.

из встроенного в насадку приемника излучения и выносного прибора для измерения. Светораспределительные призмы таких насадок бывают неподвижными и переключающимися. В первом случае световой сигнал непрерывно измеряется, во втором измерения производят только при определенном положении призмы. Примером насадки последнего типа (элементы *2*, *8*, *17*) может служить насадка фирмы К. Цейсс, Иена, показанная на рис. 98.

Если фотонасадка, кроме приемника излучения, снабжена еще и специальным электромагнитным затвором, то при фотографировании необходимая выдержка производится автоматически. В этом случае светораспределительные призмы стационарны. Такие насадки снабжены блоком, в котором смонтированы элементы электрической системы. Насадку с автоматическим затвором фирмы Виккерс можно видеть на рис. 89. Она состоит из элементов *1*, *8*, *18*.



Рис. 81. Микроскоп М20 с микрофотонасадкой фирмы Вильд для 35-мм пленки.



Рис. 82. Микрофотонасадка МФН-11 фирмы ЛОМО.

Наконец, самыми совершенными приборами являются полностью автоматизированные фотонасадки. В них после настройки прибора и фокусирования дальнейший процесс работы выполняется путем нажатия единственной кнопки. При этом автоматически производится требуемая выдержка и пленка перематывается на один кадр. Иногда прибор оснащают некоторыми дополнительными элементами: ножной педалью для включения автоматической системы, сигнализацией о слишком большой или слишком малой освещенности изображения и др.

В оптическую систему прибора «Фотоавтоматик» (рис. 83) неотъемлемой частью входит приемник излучения, на который направляется обычно около 10% светового потока. 20% световой энергии поступает в визирную трубку и 70% — в фотокамеру. Прибор имеет конструкцию закрытого типа (рис. 84). Можно указать на такие его отличительные особенности:

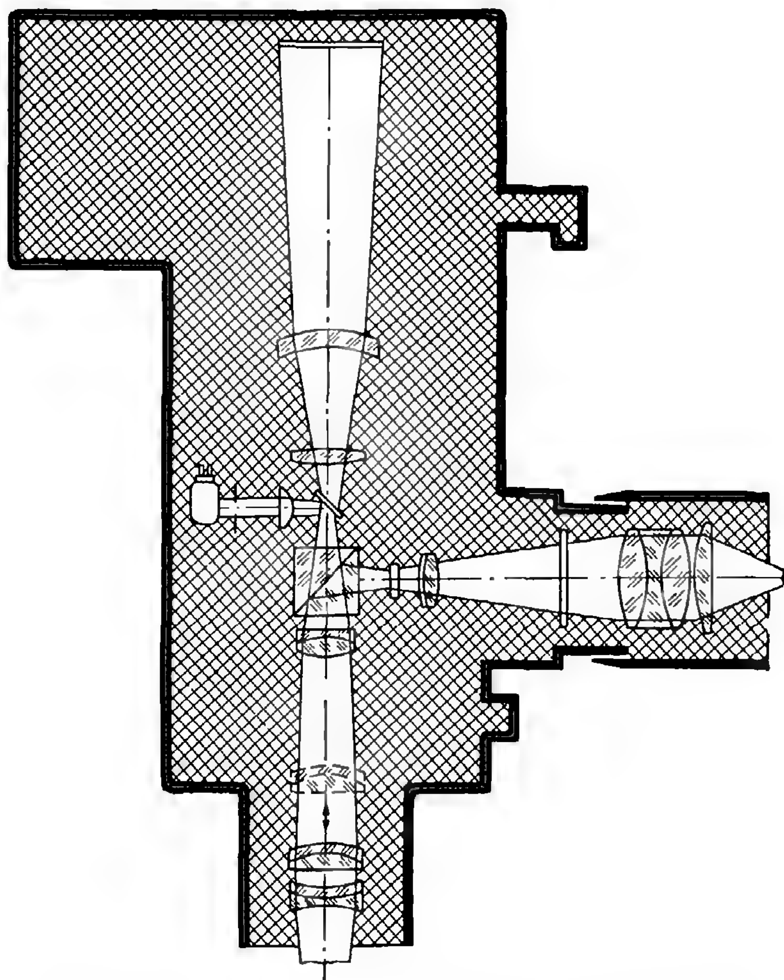


Рис. 83. Схематический разрез микрофотонасадки «Фотоавтоматик» фирмы К. Рейхерт.



Рис. 84. Микрофотонасадка «Фотоавтоматик» фирмы К. Рейхерт.

для переключения окулярного увеличения от 6.3 до $10^{\times}$ служит одна подвижная линза; на приемник излучения можно проектировать либо изображение всего поля зрения, либо только его центральную часть, выбор того или иного варианта зависит от структуры объекта. При сравни-

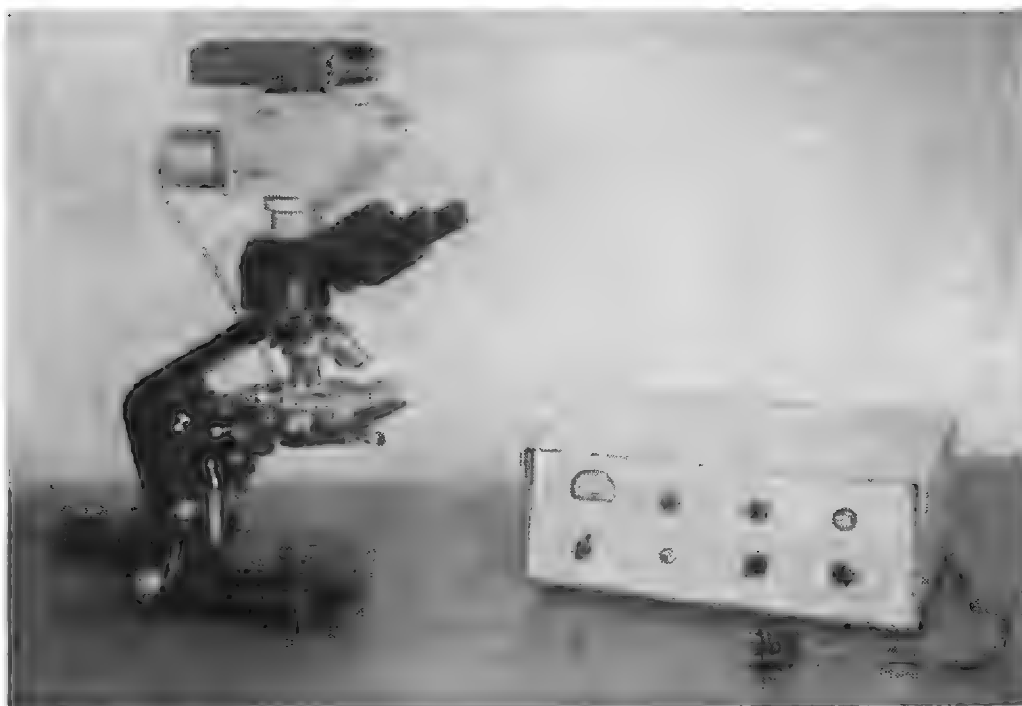


Рис. 85. Автоматическая микрофотонасадка МФНЭ-1 фирмы ЛОМО.

тельно равномерных структурах пользуются первым вариантом, второй применяют при отработке выдержки для какого-либо отдельного элемента структуры.

На рис. 85 показан внешний вид автоматической микрофотонасадки МФНЭ-1. В отличие от других насадок этого типа она снабжена бинокулярным тубусом и сменными линзовыми системами для получения трех ступеней увеличения.

10. УСТАНОВКИ ДЛЯ МИКРО- И МАКРОФОТОГРАФИИ

Установки для микро- и макрофотографии имеют хорошую устойчивость и значительную жесткость. Поэтому их применяют в случае наиболее ответственных съемок. Разнообразные виды установок комплектуются по схеме рис. 86, где приведены наиболее распространенные элементы приборов.

В зависимости от задач исследования в приборе применяются осветитель *12* с лампой накаливания мощностью 100—200 вт или *11* с дуговой лампой (ксеноновая, ртутная и т. д.). Осветители крепятся к основанию *10* установки.

При микрофотографировании микроскоп *9* устанавливается на основании *10*. Если он не имеет фототубуса, то применяют комбинированный тубус *5* или вертикальный тубус *6*. Первый из них дает возможность направлять свет в окуляр или в фотокамеру. Над микроскопом на вертикальной стойке закрепляется камера или фотонасадка, выбранная для работы. Надо сказать, что камера *2* может иметь не только обычный, но и электромагнитный затвор, автоматически вырабатывающий требуе-

мую выдержку. Установка из минимального комплекта элементов *2* и *10* [1] вместе с микроскопом показана на рис. 87.

Прибор ФМН-3 (рис. 88) состоит из элементов *2*, *5*, *10*, *12* (но в нем предусмотрена также возможность применения пленочной камеры «Зенит»). Камера прибора предназначена для работы с пластинками 9×12 см. Длина камеры может изменяться, что позволяет плавно менять масштаб изображения на пластинке. Для фокусировки служит матовый экран.

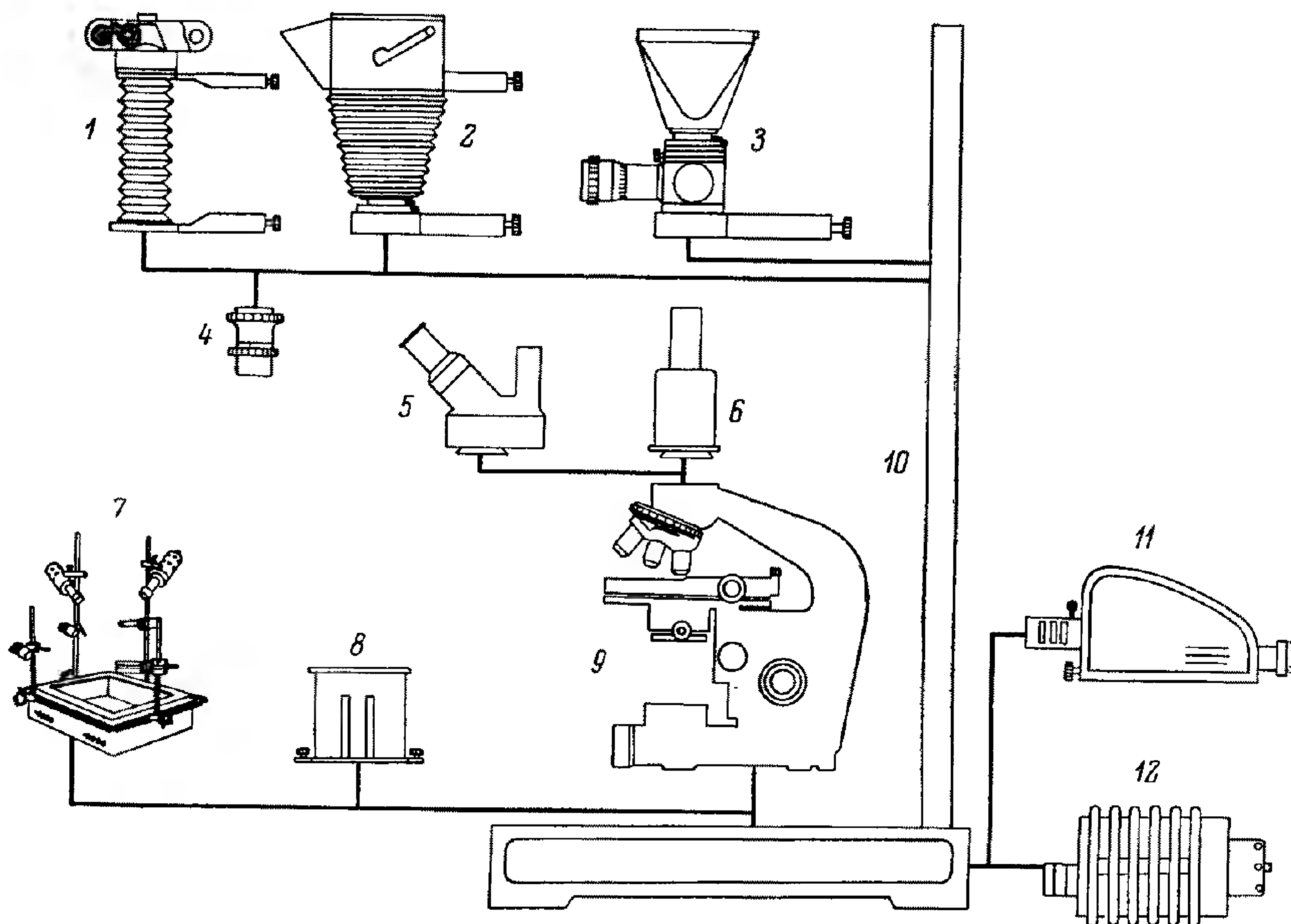


Рис. 86. Схема возможных комбинаций элементов установки для микро- и макрофотографии.

1 — зеркальная малоформатная камера; *2* — зеркальная камера для пластинок 9×12 см; *3* — микрофотонасадка обычного типа (см. рис. 76); *4* — объектив для макросъемки; *5* — тубус для наблюдения и фотографирования; *6* — вертикальный тубус; *7* — устройство для освещения непрозрачных макрообъектов; *8* — приспособление для освещения прозрачных макрообъектов; *9* — микроскоп; *10* — основание с вертикальной стойкой; *11* — осветитель с дуговой лампой; *12* — осветитель с лампой накаливания.

В качестве источника света используется лампа накаливания мощностью 170 вт. Визуальный тубус приспособлен для работы с гомалями, которые выравнивают кривизну изображения, имеющуюся у объективов микроскопа.

На рис. 89 представлен элемент *3* установки фирмы Виккерс. Он представляет собой фотонасадку обычного типа, установленную на кронштейне над тубусом микроскопа.

Прибор ФМН-2 (рис. 90) предназначен не только для микро-, но и для макрофотографирования. Первое осуществляется описанным выше способом. Для второго служат элементы *2*, *4*, *7*, *8*, *10*, *12*. Сменные объективы *4* типов микропланар и корректар обеспечивают масштаб изображения от 0.5 до 20×.

На приборе (рис. 90) можно проводить макросъемку как прозрачных, так и непрозрачных объектов. Освещение прозрачных объектов произ-

[1] Номера позиций приборов, приведенных на рис. 87—90, относятся к рис. 86.

водится с помощью оптической системы, часть которой смонтирована в основании, а часть в предметном столе *1* или *2*, устанавливаемом на основании прибора под фотокамерой. Выбор стола зависит от размера объекта. Для освещения непрозрачных объектов и некоторых видов прозрачных служит съемный софитный стол *3*. Часть осветителей смонтирована внутри

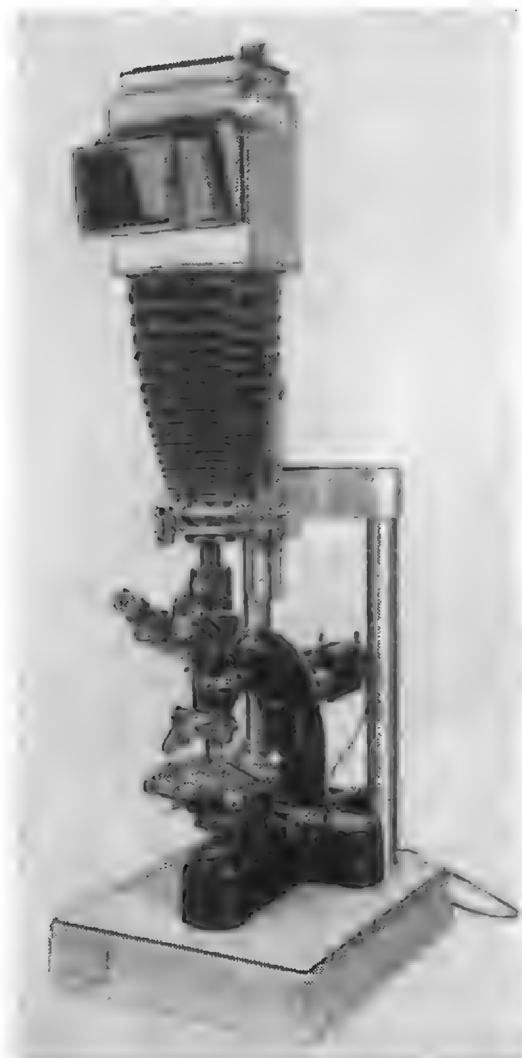


Рис. 87. Универсальная установка «Аристофот» с микроскопом «Ортолюкс» фирмы Э. Лейтц.

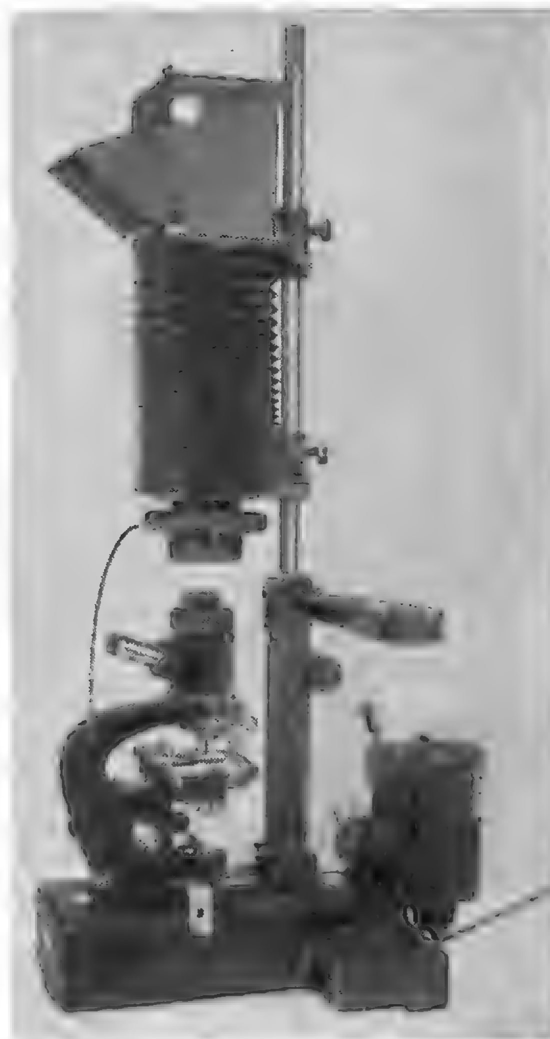


Рис. 88. Установка для микрофотографирования ФМН-3 с микроскопом МБР-3 фирмы ЛОМО.

стола, четыре — над столом на подвижных кронштейнах. Кроме того, над столом установлены два осветителя с лампами более мощными, чем лампы в софитах. Комбинируя освещение и подсветку объекта с разных сторон и под различными углами, можно подобрать такое освещение, которое позволит не только выявить на фотографии те или иные детали объекта, но также подчеркнет их рельефность и объемность.

На приборе ФМН-2 может осуществляться также стереофотографирование. Для этого объектив перемещается в горизонтальной плоскости так, как это иллюстрируется на рис. 101.

11. СТЕРЕОСКОПИЧЕСКИЕ МИКРОСКОПЫ И СТЕРЕОМИКРОФОТОГРАФИРОВАНИЕ

Более трех десятков фирм выпускает свыше 50 различных моделей стереоскопических микроскопов, которые дают возможность наблюдать объемное изображение предмета. Микроскопы делятся на два типа: при-

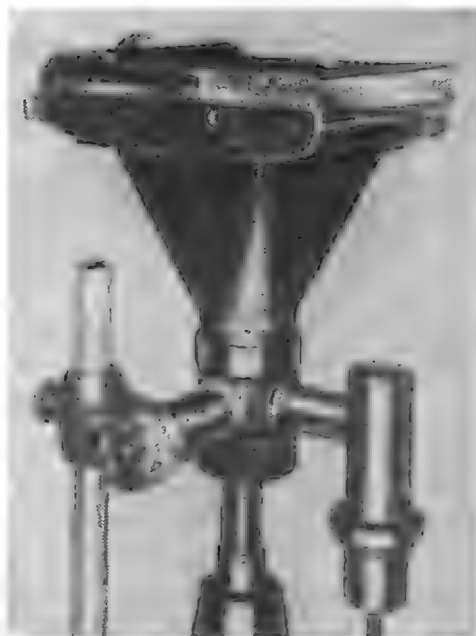


Рис. 89. Микрофотонасадка с устройством «Поляроид-Ленд» и электромагнитным затвором как часть установки для фотографирования фирмы Виккерс.



Рис. 90. Прибор для микро- и макрофотографирования ФМН-2 фирмы ЛОМО.

боры по схеме Грену и приборы типа «Цитопласт». Все они имеют реечный механизм для фокусировки. Различные модели отличаются друг от друга конструкцией штатива, обеспечивающей наблюдение прозрачных или непрозрачных, мелких или крупногабаритных объектов и т. д.

Стереоскопические микроскопы по схеме Грену

В микроскопах по схеме Грену (рис. 91) для наблюдения служат две самостоятельные оптические системы, т. е. парные объективы и бинокулярный тубус с оборачивающими призмами и окулярами.

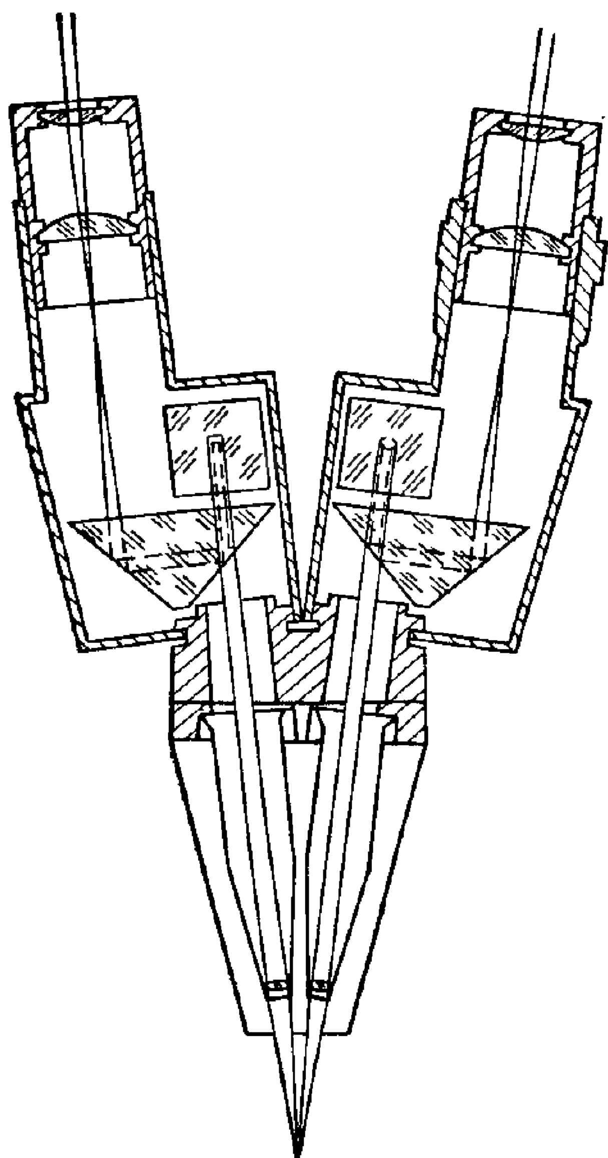


Рис. 91. Принципиальная схема стереоскопического микроскопа по схеме Грену.

Несколько микроскопов фирмы Э. Лейтц отличаются друг от друга конструкцией штатива. Штатив может быть накладным, для проходящего света, и универсальным со специальными подставками. Некоторые модели имеют механизм для двухкоординатного перемещения оптической головки в горизонтальной плоскости. Сменные объективы устанавливаются в трехгнездных салазках (рис. 92). Объективы имеют увеличение от 1 до 12$^{\times}$, окуляры — от 8 до 18$^{\times}$.

Среди многочисленных стереоскопических микроскопов выделяется микроскоп «Зумакс» фирмы Виккерс (рис. 93). Общее увеличение микроскопа изменяется от 2.5 до 180$^{\times}$ посредством трех сменных объективов, трех пар окуляров и панкратической системы. Эта система позволяет плавно изменять увеличение прибора в 9 раз. Микроскоп позволяет исследовать как прозрачные, так и непрозрачные объекты.

Стереоскопические микроскопы типа «Цитопласт»

Стереоскопический микроскоп «Цитопласт» был впервые разработан фирмой К. Цейсс, Иена (рис. 94). В нем применен один объектив, работающий одновременно на оба тубуса. За объективом установлены парные линзовые системы для изменения увеличения. В бинокулярном тубусе размещены оборачивающие призмы и окуляры. Особенность микроскопов этого типа состоит в том, что при изменении увеличения расстояние между предметом и объективом остается неизменным.

Стереоскопический микроскоп МБС-3 снабжен универсальным штативом, позволяющим наблюдать прозрачные и непрозрачные объекты, а также крупногабаритные предметы (рис. 95). Объектив имеет свободное расстояние, равное 100 мм. Изменение увеличения прибора от 4 до 100$^{\times}$ производится путем смены окуляров или переключением линзовых систем, установленных в оптической головке.

Удобную работу на стереоскопических микроскопах обеспечивает панкратическая система для плавного изменения увеличения. В микрофотографии она позволяет легко выбрать наиболее удачный масштаб изображения. Панкратическая система микроскопа SZ фирмы Олим-



Рис. 92. Стереоскопический микроскоп с фотонасадкой фирмы Э. Лейтц.



Рис. 93. Стереоскопический микроскоп с панкратической системой «Зумакс» фирмы Виккерс.

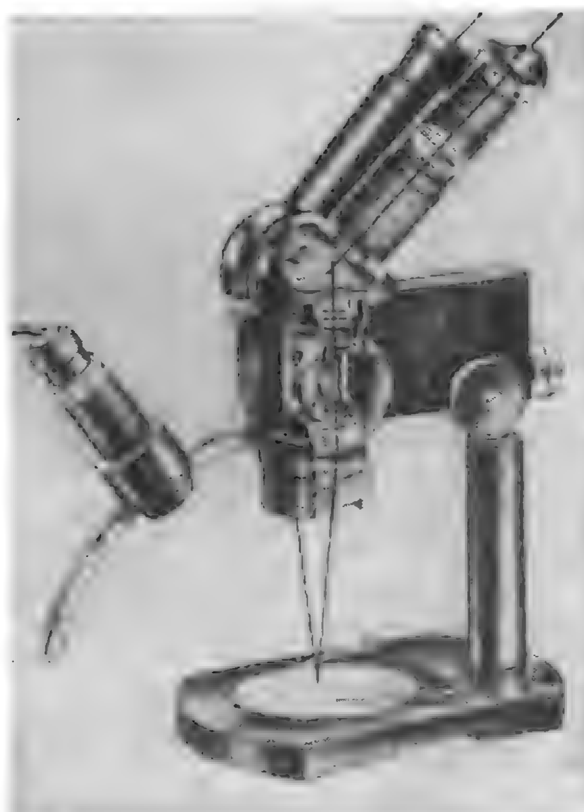


Рис. 94. Конструкция микроскопа «Цитопласт».

пус (рис. 96) изменяет увеличение прибора в 4 раза, а в микроскопе SZ-III той же фирмы ее кратность меняется в 5.7 раза. Хорошие характеристики имеет стереомикроскоп IV фирмы Оптон. Он снабжен пятикратной панкра-



Рис. 95. Стереоскопический микроскоп МБС-3 фирмы ЛОМО.

тической системой и двумя дополнительными линзами, устанавливаемыми перед объективом. Общее увеличение микроскопа может меняться в пределах от 1.6 до 200×.

Фотографирование на стереоскопических микроскопах

Техника фотографирования на стереомикроскопах в основном не отличается от той, которая будет описана в последующих главах, и имеет, пожалуй, только две особенности. Первая заключается в том, что здесь получают два снимка, составляющих стереопару (она рассматривается затем в стереоскоп обычного типа). Вторая особенность состоит в том, что при стереомикрофотографировании часто создают преимущественно одностороннее освещение объекта. Благодаря этому появляются тени, которые подчеркивают объемность предмета. Для фотографирования на стереомикроскопах, кроме микрофотонасадок обычного типа (см. рис. 92), служат следующие четыре типа принадлежностей.

1. Микрофотонасадка МФН-5 устанавливается на оптической головке микроскопа вместо бинокулярного тубуса (рис. 97). Для фокусировки пользуются зеркальным визиром фотокамеры. Насадка позволяет одновременно проэкспонировать оба кадра стереопары. Однако масштаб изображения получается небольшим — до 7×. Размер каждого кадра 24×16 мм.

2. На микроскопах фирмы К. Цейсс, Иена фотографирование производится с помощью специального фототубуса (рис. 98), который устанавливается на оптической головке вместо бинокулярного тубуса. Для съемки применяют микрофотонасадку обычного типа. Масштаб изображения может быть достаточно большим, но два кадра стереопары фотографируются последовательно. При этом необходима перестановка фототубуса. Последний снабжен ирисовой диафрагмой, позволяющей изменять глубину резкого изображения.

Устройства двух предыдущих типов требуют удаления бинокулярного тубуса микроскопа, что исключает возможность стереоскопического наблюдения объекта.



Рис. 96. Стереоскопический микроскоп SZ фирмы Олимпус.



Рис. 98. Устройство для фотографирования на стереомикроскопе фирмы К. Цейсс, Иена.



Рис. 97. Микрофотонасадка МФН-5 фирмы ЛОМО.



Рис. 99. Стереоскопический микроскоп с устройством для фотографирования фирмы ББТ Краусс.

3. Устройство для фотографирования фирмы ББТ Краусс устанавливается между оптической головкой микроскопа и бинокулярным тубусом (рис. 99). Это позволяет одновременно производить наблюдение и фотографирование объекта. Два кадра стереопары экспонируются поочередно.



Рис. 100. Устройство для фотографирования на стереомикроскопе фирмы В. Ватсон.

4. Специальный кронштейн (рис. 100) с установленной на нем микрофотонасадкой или фотокамерой размещаются над бинокулярным тубусом стереомикроскопа. Кронштейн имеет два фиксированных положения, благодаря чему можно получить кадры стереопары, установив насадку или камеру поочередно над каждым тубусом микроскопа.

Стереофотографирование с обычным микроскопом

Стереофотографирование на обычном микроскопе можно выполнить, если зафиксировать два изображения одного объекта под различными углами зрения. Осуществляется это одним из следующих двух способов (рис. 101).

1. Если в плоскости выходного зрачка (рис. 101, *а*) объектива *2* поместить диафрагму *3*, закрывающую половину зрачка, то объект *1* будет виден как бы сверху слева. Перевернув диафрагму на 180°, можно получить на фотопластинке *4* изображение объекта, соответствующее наблюдению сверху справа. Такой способ применяют на микроскопах обычного типа. В тех случаях, когда диафрагму нельзя разместить в зрачке объектива, ее располагают в какой-либо плоскости, сопряженной со зрачком.

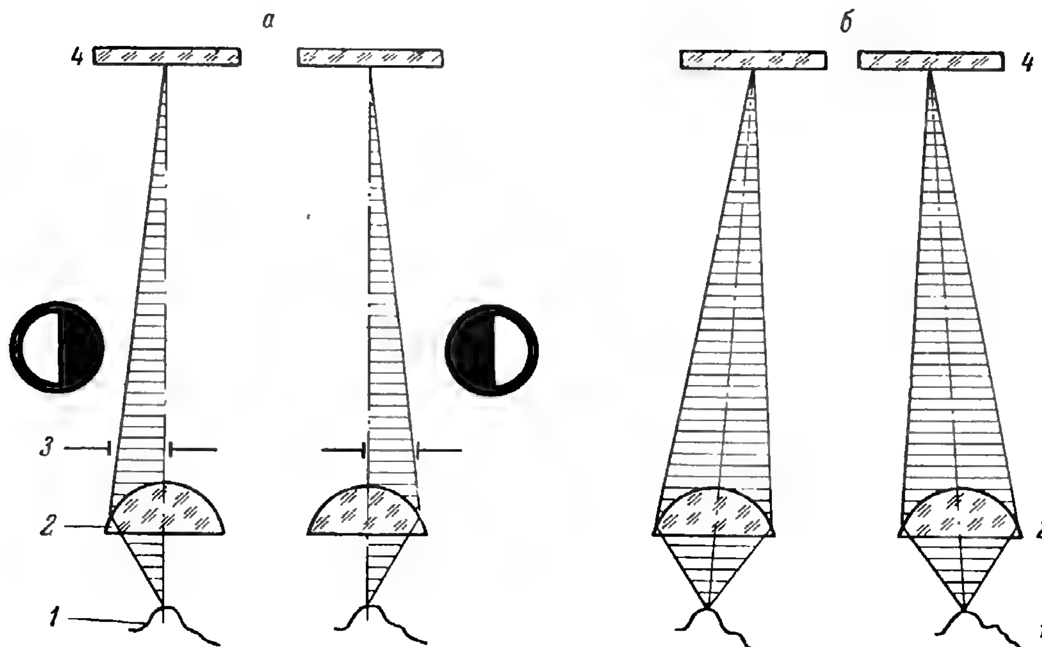


Рис. 101. Принципиальная схема стереофотографирования с одним объективом.

а — объектив неподвижный; *б* — объектив подвижный.

Диафрагма может быть заменена другим приспособлением аналогичного действия (например, поляроидами).

2. Второй способ заключается в том, что объект *1* фотографируется на пластинки *4* дважды при различных положениях объектива *2*, как это показано на рис. 101, *б*. Здесь при смещении объектива требуется смещать соответственно и объект. В противном случае на кадрах стереопары будут засняты несколько различные участки объекта. При монтаже кадры должны быть ограничены так, чтобы на них остались изображения одного и того же участка. Этот способ применяется обычно при макрофотографировании на установках типа ФМН-2.

Надо обратить внимание на следующее обстоятельство. Если на фотографии изображение перевернуто относительно предмета, то для получения правильного стереоэффекта необходимо при монтаже стереопары поменять местами правый и левый снимки.

12. ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ДЛЯ МИКРОФОТОГРАФИРОВАНИЯ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Осветители

Большинство микроскопов или не имеет встроенных осветителей, или имеет осветители с лампами накаливания, мощность которых не превышает 30 вт. Освещенность изображения при этих лампах бывает настолько мала, что затрудняет фотографирование. Особенно неблагоприятны условия съемки при исследовании в свете флуоресценции, по методу фазового контраста, в поляризованном свете и при изучении непрозрачных объектов. Для того чтобы получить достаточную освещенность применяют осветители с источниками, имеющими большую яркость.



Рис. 102. Осветитель ОИ-24 фирмы ЛОМО.



Рис. 103. Осветитель с ксеноновой лампой сверхвысокого давления фирмы Э. Лейтц.

На рис. 102 показан осветитель ОИ-24 с лампой накаливания мощностью 100 вт. Прибор комплектуют набором светофильтров, который полезен во многих случаях фотографирования.

Еще более ярким источником света (дуговой ксеноновой лампой сверхвысокого давления мощностью 200 вт) снабжен, например, осветитель фирмы Э. Лейтц, представленный на рис. 103. В корпус осветителя вмонтированы подвижные салазки со сменными светофильтрами. Кроме

того, в осветителе имеется выключающееся зеркало, которое позволяет применять для освещения объекта одновременно второй осветитель с низковольтной лампой накаливания.

Подобные осветители могут быть также с дуговыми лампами иного типа, например со ртутными. Последние применяют для исследований в свете флуоресценции. Таким осветителем снабжен прибор, показанный на рис. 57.

Фотоэкспонометры

Фотоэкспонометр облегчает подготовку к съемке, позволяя за короткое время определить с достаточной степенью точности выдержку, которая необходима на данном приборе и при данном фотоматериале для получения качественного негатива. Экспонометр состоит из приемника излучения, воспринимающего световой поток, и измерительной системы. Сложность последней зависит от условий работы, на которые рассчитан экспонометр.

Время экспозиции, необходимое для получения нормального почернения негатива, обратно пропорционально освещенности изображения

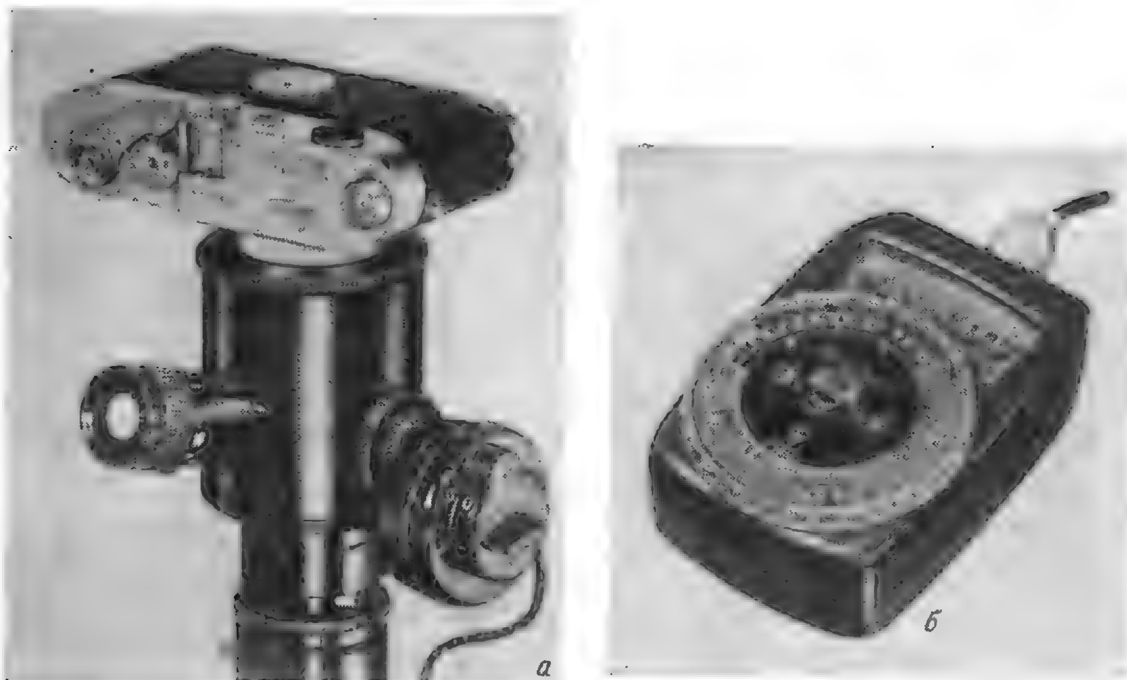


Рис. 104. Фотоэкспонометр «Микросикс-Л» фирмы Э. Лейтц.

а — микрофотонасадка с приемником излучения экспонометра; б — измерительное устройство.

и светочувствительности материала. Если приемник экспонометра помещается в плоскости фотослоя (или сопряженной с ним), то для определения выдержки необходимо, чтобы в процессе измерения была учтена какимлибо образом светочувствительность материала. Делается это применением в измерительном приборе специальной шкалы или с помощью градуировочных кривых. Таковы простейшие экспонометрические устройства. Но работа с ними не очень удобна.

Часто предпочтительней устанавливать приемный элемент экспонометра на выходе визирной трубки вместо окуляра визуального тубуса или в другом удобном месте, где освещенность не равна освещенности фотослоя. В таких случаях для определения выдержки необходимо учитывать параметры окуляра, визирной трубки или иных элементов прибора. Осуществляется это с помощью специальных номограммных шкал, оптических или электрических компенсирующих устройств в экспонометре.

Примером экспонометра с номограммными шкалами может служить устройство «Микросикс-Л» фирмы Э. Лейтц. Приемником излучения здесь служит селеновый фотоэлемент. Он устанавливается в специальном гнезде на корпусе фотонасадки, справа от визирной трубки (рис. 104), но может быть помещен и в другом месте. Фотоэлемент подключается к измерительному устройству, состоящему из гальванометра и круговых шкал, которые служат для установки на приборе значений светочувствительности материала и характеристик микроскопа.

Иной принцип действия лежит в основе экспонометра «Ремифот». Этот прибор требует для своей работы внешнего источника питания. Экспонометр (рис. 105) при измерении помещается в тубус микроскопа вместо окуляра. Значения светочувствительности материала, приборного фактора и увеличения окуляра устанавливаются заблаговременно по соответствующим шкалам. Для определения выдержки наружное кольцо экспонометра поворачивают до тех пор, пока стрелка гальванометра не расположится в смотровом окне. Стрелка в этом положении указывает время экспозиции.



Рис. 105. Фотоэкспонометр «Ремифот» фирмы К. Рейхерт.

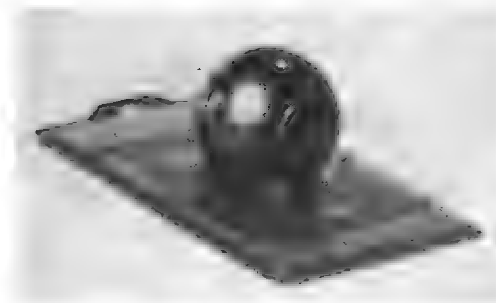


Рис. 106. Экспонометр для пластиночной камеры фирмы Оптон.

Оба описанных экспонометра, как и большинство других подобных устройств, предназначены в основном для установки их вместо окуляра микроскопа. Однако существуют экспонометры, приемник излучения которых на время измерений располагается непосредственно в плоскости фотоэмульсии. Фирма Оптон выпускает, например, экспонометр, приемник которого смонтирован в оправе (рис. 106), предназначенной для помещения ее в фотокамере вместо кассеты с пластинкой.

Предметные и покровные стекла

Предметные и покровные стекла должны соответствовать по толщине, показателю преломления и дисперсии значениям, принятым при расчете объективов и конденсоров микроскопа. В противном случае они будут ухудшать качество изображения. Особенно важно соблюдать расчетные значения при ответственных экспериментах. При менее ответственных работах можно допустить некоторые отступления этих величин от номинальных значений. Требования к предметным и покровным стеклам тем

выше, чем больше апертура объективов. Кроме того, эти требования зависят от метода наблюдения.

Стекла, применяемые при исследованиях в поляризованном свете, не должны иметь двойного лучепреломления, т. е. они должны быть темными между скрещенными поляризатором и анализатором.

Стекла, применяемые во флуоресцентной микроскопии, не должны иметь собственной флуоресценции: поле зрения с этими стеклами в отсутствие объекта и при скрещенных светофильтрах должно быть темным.

При исследованиях по методу темного поля следует использовать стекла, на поверхности которых отсутствуют царапины, точки и другие дефекты, могущие привести к появлению излишнего рассеянного света.

В ультрафиолетовой микроскопии должны применяться стекла из кварца, который прозрачен в коротковолновой области спектра.

Предметные стекла обычно бывают размером 46×26 и 76×26 мм. Их показатель преломления равен $n_D=1.52 \pm 0.01$, а коэффициент дисперсии $\nu=60 \pm 2$. Толщина предметного стекла не должна превышать 1—1.2 мм. При большей толщине с некоторыми типами конденсоров (особенно с конденсором темного поля) нельзя настроить освещение должным образом. При проведении ответственных работ следует пользоваться плоско-параллельными стеклами с хорошими поверхностями. Проверить это можно так. Если посмотреть на зеркальное изображение в стекле, например, переплета окна, то в случае непараллельности поверхностей стекла изображение переплета раздвоится, а при плохом качестве поверхности предметного стекла изображение будет искаженным.

Покровные стекла бывают чаще всего двух размеров — 18×18 и 24×24 мм. Их показатель преломления равен $n_D=1.516 \pm 0.002$, а коэффициент дисперсии $\nu=60 \pm 2$. Так как покровное стекло находится между предметом и объективом, то на качество покровных стекол следует обратить особое внимание. Местные дефекты поверхности стекла можно обнаружить так же, как и у предметного стекла, рассматривая отражение в нем переплета окна. Покровные стекла часто имеют кривизну. Для отбора стекол их следует положить на предметное стекло с хорошей поверхностью и рассматривать в них зеркальное изображение, например, потолочной лампы или плафона. Если покровное стекло искривлено, то изображение лампы, отраженное от него, будет отличаться размерами и формой от изображения, отраженного от предметного стекла. Различие будет тем больше, чем больше кривизна.

Очень большое влияние на качество изображения в микроскопе оказывает отклонение толщины покровного стекла от номинального значения, которое при расчете объективов принимается равным 0.17 мм. Эта величина должна выдерживаться тем точнее, чем больше апертура объектива. Если для средних объективов можно допустить отступление от номинальной толщины на 0.02 мм, то при объективах с апертурой больше 0.6 нужно применять стекла расчетной толщины.

Объективы масляной иммерсии менее чувствительны к изменению толщины покровного стекла, так как показатели преломления стекла и масла очень близки по своим значениям. С иммерсионным объективом целесообразно применять покровные стекла толщиной от 0.10 до 0.17 мм не более. В противном случае легко повредить препарат или объектив, так как свободное расстояние последнего составляет около 0.1 мм.

При получении партии предметных и покровных стекол полезно измерить и рассортировать их по толщинам. Измерения можно производить с помощью микрометра, но делать это надо осторожно, чтобы не поцарапать стекла.

Иммерсионные жидкости

Применение иммерсионных жидкостей в микроскопии диктуется одним из следующих трех соображений.

1. Как следует из гл. II, иммерсионная жидкость позволяет увеличить апертуру объектива, что в свою очередь повышает разрешающую способность микроскопа.

2. Иммерсионная жидкость дает возможность уменьшить коэффициент отражения первой поверхности оптической системы микроскопа, благодаря чему уменьшается количество рассеянного света. Таким образом можно повысить контраст изображения непрозрачного слабо отражающего объекта, например аншлифа угля.

3. Если объект находится в определенной среде (например, биологический объект в физиологическом растворе) или требуется просматривать объекты по большой глубине (например, ядерные фотоэмульсии), то иммерсионная жидкость обеспечивает необходимое качество изображения.

Иммерсионной жидкостью заполняют пространство между объективом и препаратом, а в случае надобности также между конденсором и препаратом. В табл. 6 приведены оптические характеристики иммерсионных жидкостей, применяемых в микроскопии.

ТАБЛИЦА 6

Оптические характеристики иммерсионных жидкостей

	Температура, °C	Показатель преломления n_D	Коэффициент дисперсии $\nu = \frac{n_D - 1}{n_F - n_C}$
Кедровое масло	21	1.5150	48.6
Водный раствор глицерина (74% глицерина, 26% воды)	21	1.4343	59.7
Вазелиновое масло	24.5	1.5028	46.4
Монобромнафталин	21	1.6562	20.6
Иодо-метилен	21	1.7413	19.5
Вода	20	1.3330	55.5

Наиболее распространено в микроскопии кедровое масло. В последнее время его часто заменяют искусственным маслом, оптические характеристики которого не отличаются от характеристик кедрового масла. Монобромнафталиновая иммерсия, имеющая большой показатель преломления, служит в основном для наблюдения непрозрачных объектов в отраженном свете. Глицериновая и водная иммерсии используются как в обычной, так и в ультрафиолетовой микроскопии, причем водная особо предпочтительна при исследовании живых объектов, находящихся в физиологическом растворе. Вазелиновую иммерсию применяют сравнительно редко в ультрафиолетовой микроскопии. С иодо-метиленовой иммерсией работают при исследовании слабо отражающих руд и горных пород.

Иммерсионная жидкость должна быть прозрачна, однородна, не повреждать объектив и разрушать или токсически воздействовать на препарат. Оптические характеристики иммерсионных жидкостей должны соответствовать тем номинальным значениям, которые были приняты при расчете соответствующих иммерсионных объективов, — в противном случае неизбежно ухудшается качество изображения. Допустимые отклонения пока-

зателя преломления и дисперсии жидкости от номинальных значений тем меньше, чем больше апертура объектива и толщина иммерсионного слоя.

Иммерсионные жидкости, применяемые во флуоресцентной микроскопии, не должны флуоресцировать под действием сине-фиолетового и ультрафиолетового излучений.

Со временем иммерсионные жидкости могут изменять свои свойства. Например, масло густеет, вода испаряется из глицериновой иммерсии и т. д. Это приводит к изменению оптических характеристик жидкости.

На оправах иммерсионных объективов всегда имеется указание, с какой именно иммерсионной жидкостью следует применять данный объектив.

Глава IV

ФОТОГРАФИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И ИХ ОБРАБОТКА

Качество и скорость получения микрофотоснимка определяются в значительной степени типом применяемого фотографического материала, выбор которого зависит от окраски и освещенности исследуемого объекта, области спектра, в которой производится фотографирование, источника света, светофильтров, а также от масштаба изображения.

Ниже приводятся некоторые основные сведения из теории фотографического процесса, необходимые для рационального выбора фотографического материала и оптимальных условий его обработки. Характеристики фотографических материалов, применяемых при микрофотографировании, даны в гл. V.

1. ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ФОТОГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Характеристическая кривая

Основные свойства фотографического материала могут быть определены из его характеристической кривой. Характеристическая кривая выражает зависимость оптической плотности почернения D от логарифма количества освещения (или экспозиции) $\lg H$, падающего на материал при его экспонировании. Типичная характеристическая кривая приведена на рис. 107. Участок AB кривой называется начальным участком или областью недодержек. На этом участке интервал яркости объекта съемки воспроизводится с некоторым искажением из-за нелинейного (более медленного) нарастания плотности почернения при увеличении логарифма количества освещения или экспозиции. Участок BC — прямолинейный участок, характеризующийся линейной зависимостью плотности от логарифма количества освещения. Таким образом, в пределах этого участка интервал яркости объекта передается пропорциональным ему интервалом плотностей изображения. Участок CE — конечный участок характеристической кривой или область передержек, в котором наблюдается непропорциональное (так же как и на участке AB, более медленное) нарастание оптической плотности с увеличением логарифма экспозиций, вследствие чего в изображении, соответствующему этому участку кривой, интервал яркости объекта съемки будет уменьшен. У ряда фотографических материалов по достиже-

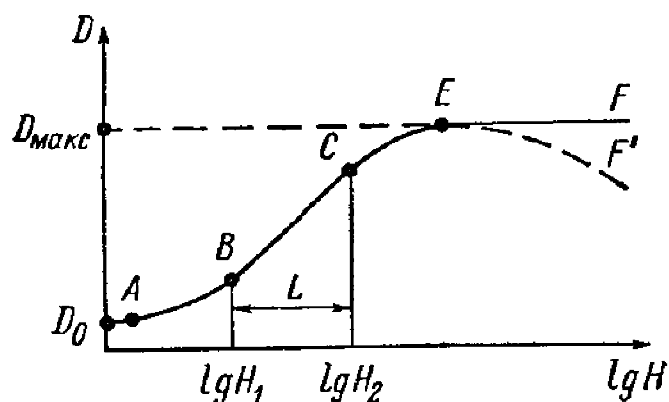


Рис. 107. Характеристическая кривая фотоматериала.

нии наивысшей плотности (в точке E) обнаруживается еще наклонный участок EF', называемый областью соляризации, характеризующийся уменьшением плотности с увеличением логарифма количества освещения.

Плотность D_0 называется плотностью вуали, величина которой определяется свойствами самого фотографического материала и условиями его химико-фотографической обработки.

Наибольшая возможная оптическая плотность почернения при данных условиях проявления, т. е. оптическая плотность в высшей точке характеристической кривой, называется верхним пределом почернения, или максимальной плотностью $D_{макс}$.

Фотографическая широта

Разность логарифмов экспозиций, соответствующих началу и концу прямолинейного участка характеристической кривой, называется *фотографической широтой* $L = \lg H_2 - \lg H_1 = \lg \frac{H_2}{H_1}$ (см. рис. 107). Фотографическая широта характеризует способность материала воспроизводить детали объекта пропорциональными им значениями плотностей негатива или позитива при отклонениях в экспозициях при съемке или печати изображения. Зная численное значение широты применяемого для съемки фотографического слоя, можно найти отношение $H_2 : H_1$ между экспозициями, соответствующими концу и началу прямолинейного участка характеристической кривой, а тем самым численно выразить диапазон правильных, или нормальных, экспозиций, при которых данная деталь объекта передается пропорциональным ей значением почернения в изображении этой детали, получаемом на негативе микрофотоснимка.

Практически смысл фотографической широты светочувствительного слоя, примененного для фотографирования микрообъекта, заключается в следующем. Пусть максимальный интервал яркости снимаемого объекта, т. е. разность логарифмов световых потоков, прошедших через детали фотографируемого с помощью микроскопа объекта, равен

$$l_0 = \lg \Phi_{макс} - \lg \Phi_{мин} = \lg \frac{\Phi_{макс}}{\Phi_{мин}} = 1,$$

где $\Phi_{макс}$ и $\Phi_{мин}$ — соответственно максимальный и минимальный световые потоки, прошедшие через отдельные детали объекта; например, $\Phi_{макс}$ — световой поток, прошедший через пустое место микропрепарата (или наиболее прозрачную структуру), а $\Phi_{мин}$ — через наиболее плотную его структуру. Такое отношение $\left| \lg \frac{\Phi_{макс}}{\Phi_{мин}} = 1 \right|$ является при фотографировании микропрепаратов вполне реальной величиной, так как соответствует оптической плотности структур фотографируемого объекта, близкой к 1 (в случае съемки в отраженном свете $\Phi_{макс}$ и $\Phi_{мин}$ — максимальная и минимальная величины световых потоков, отраженных деталями объекта; в случае фотографирования флуоресцирующих объектов $\Phi_{макс}$ и $\Phi_{мин}$ — соответственно интенсивности флуоресценции наиболее яркой и слабо флуоресцирующих микроструктур или фона). При фотографировании такого объекта световой поток, прошедший через самую прозрачную структуру препарата, будет в 10 раз превышать величину светового потока, прошедшего через наиболее темную структуру. Очевидно, что в том же соотношении будут находиться и крайние значения освещенности в разных участках фотографического слоя при съемке данного объекта, а также экспозиции, которые будут при этом сообщены фотослою.

Пусть широта фотографического материала, примененного для съемки, равна $L = \lg \frac{H_2}{H_1} = 1.60$ (негативная пленка МЗ или пленка Фото 130). Такая величина широты означает, что предельные экспозиции, соответствующие прямолинейному участку характеристической кривой, находятся в отношении $H_2 : H_1 = 40 : 1$. Легко видеть, что, фотографируя указанный объект на данной пленке, получаем широту выдержек в пределах $40 : 10 = 4$, представляющую собой по существу допуск в выборе выдержек в пределах 4 : 1, при котором эти выдержки лежат в области нормальных экспозиций, т. е. все детали объекта будут при этом передаваться пропорциональными им значениями плотностей почернений деталей проявленного негатива. Если интервал яркости объекта равен 2, что соответствует, например, объекту с оптической плотностью $D=2$, то при фотографировании такого объекта на пленки МЗ или Фото 130 его детали в изображении будут переданы с искажениями.

Такой допуск выдержек при фотографировании объекта с интервалом прошедших через его структуры световых потоков, равным 1, минимален (близок к 1) при применении для фотографирования высококонтрастных слоев, таких как диапозитивные пластинки, пленка Микрат и некоторых других материалов. Это означает, что для правильной передачи на микрофотоснимке деталей фотографируемых на этих материалах объектов необходимо точно определить выдержку. Обычно фотографическая широта тем больше, чем ниже контрастность фотографируемого материала. При фотографической печати полученного при съемке негатива следует учитывать широту применяемого для печати позитивного материала, например фотобумаги или позитивной пленки, что существенно для правильной передачи в позитивном изображении деталей почернения негатива, а следовательно, и объекта съемки. Практически это и осуществляется при выборе номера фотобумаги, на которой производится фотографическая печать. Отметим, что фотографическая широта бромосеребряной бумаги «Унибром» находится в пределах значений от 1.8 (бумага № 1) до 0.4 (бумага № 7).

Контрастность фотографического материала

Из характеристической кривой фотографического слоя следует, что оптическая плотность почернения негатива связана определенным образом с экспозициями. У различных фотографических слоев скорость нарастания почернений с изменением экспозиции меняется неодинаково: в одних слоях почернения растут с возрастанием экспозиций быстрее, в других медленнее. Для одного и того же сорта материала скорости нарастания почернения зависят от длительности проявления. Эту разницу в скоростях нарастания почернений легко видеть из сравнения кривых рис. 108.

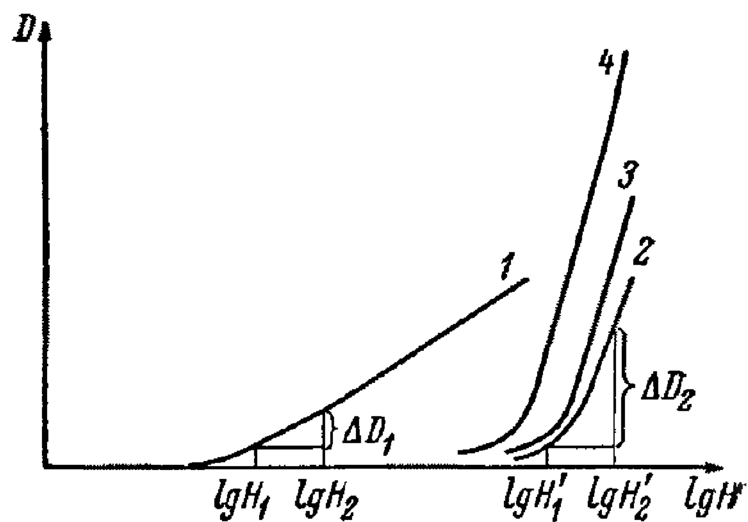


Рис. 108. Характеристические кривые.

1 — для пленки Фото 65; *2* — для диапозитивной пластинки при времени проявления $t = 2$ мин.; *3* — то же при $t=4$ мин.; *4* — при $t=8$ мин.

Свойство разных фотографических слоев передавать одни и те же скачки в экспозициях различным приростом плотностей характеризуют коэффициентом контрастности этих слоев. Так, в приведенном выше примере один интервал яркостей снимаемого объекта при одинаковых условиях проявления диапозитивными пластинками будет передан более контрастно (большим интервалом

плотностей негатива ΔD_2), пленкой Фото 65 или КН-1 — менее контрастно (меньшим интервалом плотностей ΔD_1); светопередача деталей объекта в последнем случае будет сравнительно мягкой. Степень контрастности фотографического материала характеризуется наклоном прямолинейного участка характеристической кривой к горизонтальной оси:

$$\gamma = \operatorname{tg} \alpha = \frac{D_2 - D_1}{\lg H_2 - \lg H_1} = \frac{\Delta D_1}{\lg H_2 - \lg H_1}.$$

При $\gamma = 1$ передача деталей объекта фотографическим слоем оказывается нормальной, при $\gamma > 1$ — более контрастной, т. е. интервал почернений фотослоя будет больше интервала яркостей соответствующих структур объекта, при $\gamma < 1$ передача деталей объекта будет «мягкой» или «вялой».

Как видно из рис. 108, величина коэффициента контрастности зависит от продолжительности проявления фотографического материала. Увеличение времени проявления до некоторого значения влечет за собой увеличение коэффициента контрастности, достигающего при определенном для данного фотографического материала времени проявления максимальной величины, называемой максимальным коэффициентом контрастности ($\gamma_{макс}$). Величина $\gamma_{макс}$ является характерной для каждого сорта фотографического материала. В справочниках по фотографическим материалам, кроме значения $\gamma_{макс}$, для кино- и фотопленок приводится также значение рекомендованного значения коэффициента контрастности ($\gamma_{рек}$) — нормированного для каждой группы материалов, близкое к практически применяемым значениям γ, и время проявления фотографических материалов, необходимое для достижения этого значения коэффициента контрастности.

Следует отметить, что коэффициент контрастности многих материалов зависит от спектрального состава света, падающего на фотографический слой. При освещении фотографических слоев ультрафиолетовыми лучами γ меньше, чем при освещении видимым светом. Эта разница в γ довольно велика для низкочувствительных слоев и незначительна или вовсе отсутствует для высокочувствительных.

Светочувствительность фотографического материала

Светочувствительность фотографического слоя (S) определяется величиной, обратно пропорциональной количеству освещения, создающего на данном фотографическом слое в результате его проявления заданный фотографический эффект, например определенную оптическую плотность почернения: $S = k/H_{кр}$, где k — коэффициент пропорциональности, $H_{кр}$ — экспозиция, соответствующая определенной точке характеристической кривой, называемой критерием светочувствительности. Очевидно, что чем больше экспозиция, требующаяся для достижения плотности, соответствующей данной точке характеристической кривой, тем меньше величина светочувствительности S.

В различных системах сенситометрии (учения об измерении фотографических свойств светочувствительных слоев) в качестве критериев принимаются разные точки характеристической кривой. В советской системе сенситометрии черно-белых фотографических материалов (ГОСТ 2817-50) светочувствительность фотографических материалов общего назначения и кинопленок определяется формулой

$$S_{0,2} = \frac{1}{H_{D_0 + 0,2}} \; [\text{лк}^{-1} \cdot \text{сек.}^{-1}],$$

т. е. светочувствительность выражается величиной, обратной экспозиции, которая необходима для получения при данных условиях химико-фотографической обработки оптической плотности $D = 0.2 + D_0$, где D_0 — опти-

ческая плотность вуали. Единица светочувствительности по ГОСТу (сокращенно называемая единицей ГОСТа) есть светочувствительность такого фотографического материала, на котором при определенных условиях обработки экспозиция в 1 лк·сек. создает оптическую плотность $Д=0.2+Д_0$.

Светочувствительность материалов по ГОСТу 10691-63 определяется величиной, обратной экспозиции, необходимой при определенных условиях обработки для создания оптической плотности $Д=0.85+Д_0$:

$$S_{0.85}=\frac{10}{H_{D_0+0.85}}\ [\text{лк}^{-1}\cdot\text{сек.}^{-1}].$$

За рубежом приняты другие критерии светочувствительности. Для практических работ по микрофотографии, связанных, в частности, с применением экспонометров для определения выдержек, полезна табл. 7, дающая примерные соотношения между числами светочувствительности негативных фотографических материалов средней контрастности ($\gamma=0.8$—1.0) в разных системах сенситометрии. Приближенные соотношения светочувствительности в различных системах сенситометрии для материалов средней контрастности ($\gamma=0.8$—1.0) таковы:

$$S_{\text{ГОСТ}}=0.04S_{\text{Х и Д}},$$

$$S_{\text{ГОСТ}}=0.65\ \text{antilog}\ 0.1S_{\text{ДИН}},$$

$$S_{\text{ГОСТ}}=0.80S_{\text{АСА}}.$$

ТАБЛИЦА 7

Соотношения между числами светочувствительности негативных фотографических материалов средней контрастности ($\gamma=0.8\div1.0$) в разных системах сенситометрии

$S=\frac{1}{H_{D=0.2+D_0}}$ (ед. ГОСТа 2817-50)	$S=\frac{10}{H_i}$ градусы, по Хертеру и Дриффилду)	$S=10\lg\frac{1}{H_{D=0.1+D_0}}$ (ДИН 4512-1961)	$S_x=\frac{0.8}{H_{D=0.1+D_0}}$ (АСА РН 2, 5-1960)
1.0	25	2	1.2
2.0	50	5	2.5
4.0	100	8	5.0
8.0	200	11	10
16	400	14	20
32	800	17	40
65	1600	20	80
130	3200	23	160
250	6500	26	320
500	13000	29	650
1000	25000	32	1200

Наряду с числом светочувствительности, характеризующим общую, интегральную чувствительность фотографического материала по всей видимой области спектра, существенной характеристикой материала является его *спектральная светочувствительность* к монохроматическому излучению, которая обычно выражается кривой $\lg S_\lambda=f(\lambda)$. По спектральной светочувствительности фотографические слои разделяются на несенсибилизированные и на оптически сенсибилизированные, т. е. очувствленные к определенной области спектра с помощью специальных красителей-сенсибилизаторов. Чувствительность несенсибилизированных материалов определяется областью собственной чувствительности галоидных солей серебра фотографической эмульсии, распространяющейся от ультрафиолетовых лучей до лучей с длиной волны 500 нм. Светочувствительность сенсибилизированных слоев определяется свойствами как галоидных солей, так и красителей и простирается до более длинноволновой области спектра.

Фотографические материалы, в зависимости от их спектральной чувствительности, разделяются на следующие типы (рис. 109): *1* — несенсибилизированные (синечувствительные до $\lambda=500$ нм); *2* — ортохроматические (зеленочувствительные до $\lambda=600$ нм); *3* — панхроматические (красночувствительные до $\lambda=650$—700 нм), но с небольшим провалом в лучах зеленой области спектра; *4* — изопанхроматические (равномерночувствительные до $\lambda=630$—680 нм), без значительного провала в лучах зеленой области спектра; *5* — инфрахроматические, очувствленные к различным участкам инфракрасной области спектра. В названии инфрахроматических матери-

алов обычно приводится цифра, указывающая максимум добавочной чувствительности материала в инфракрасной области спектра, например пленка Инфра-880 имеет максимум добавочной чувствительности при длине волны 880 нм.

Одна и та же экспозиция $H=Et$ может быть получена при различных соотношениях освещенности и времени экспонирования. Если уменьшить

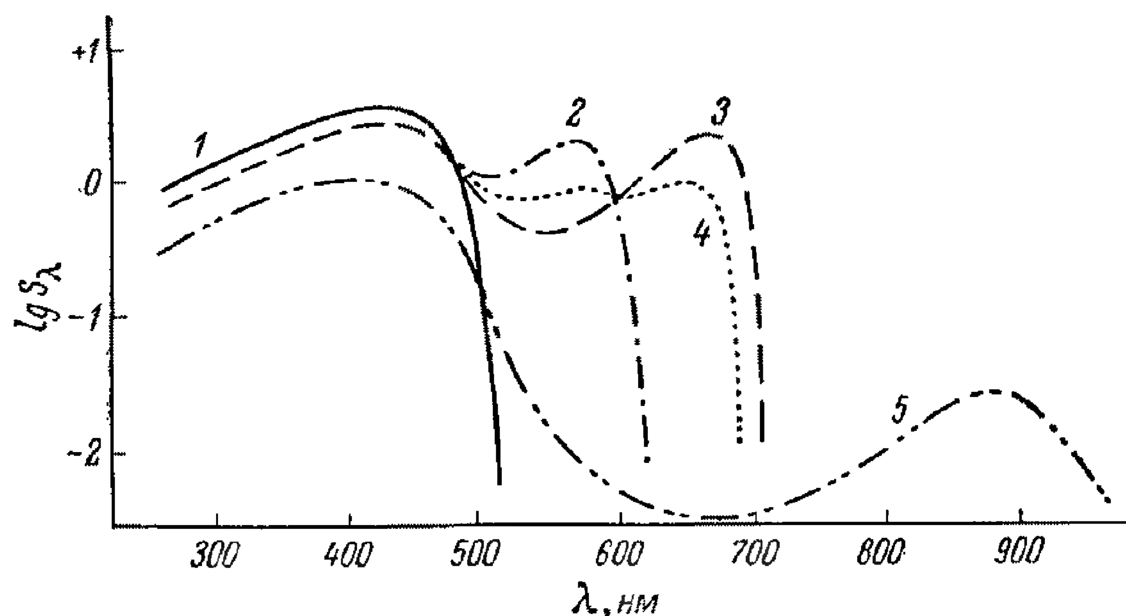


Рис. 109. Кривые спектральной чувствительности различных фотоматериалов.

в определенное число раз освещенность E и во столько же раз увеличить время освещения t, то получающийся фотографический эффект в большинстве случаев будет в той или иной степени отличаться от первоначального. Другими словами, оптическая плотность $Д$, служащая мерой фотографического эффекта, не является однозначной функцией количества освещения H, а зависит от двух переменных: освещенности E и выдержки t. Это явление, называемое *невзаимозаместимостью*, принято оценивать по форме «изоопаки» (кривой равной плотности), т. е. кривой, показывающей, как зависит логарифм количества освещения, небходимого для достижения определенной плотности почернения, от логарифма выдержки. Типичные изоопаки для высокочувствительной аэропленки (кривая *1*) и низкочувствительной несенсибилизированной пленки типа Микрат (кривая *2*) представлены на рис. 110. Обычно изоопака представляет собой вогнутую кривую, имеющую два более или менее параллельных оси абсцисс участка, в пределах которых светочувствительность при неизменном количестве освещения не зависит от выдержки или освещенности. Точка минимума изоопаки соответствует наибольшей светочувствительности фотографического слоя, так как в этой точке для достижения данного фотографического эффекта (т. е. определенной плотности почернения) требуется наименьшее количество освещения. В среднем светочувствительность высокочувствительных материалов максимальна при выдержках $t={}^1/_{20}-{}^1/_{100}$ сек., а низкочувствительных позитивных — при $t={}^1/_{10}$ сек.

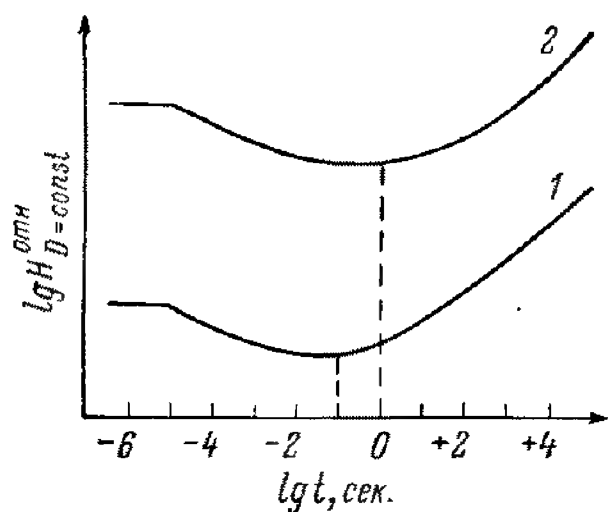


Рис. 110. Изоопаки высоко- (*1*) и низкочувствительной (*2*) пленок.

Светочувствительность фотографических материалов определяется, согласно стандарту на сенситометрические испытания, при кратковременной выдержке в ${}^1/_{20}$ сек. Светочувствительность материала при длительных или очень коротких выдержках, вследствие явления невзаимозаместимости,

будет отличаться от светочувствительности, определенной при сенситометрических испытаниях, указываемой обычно на упаковке материала. Существенно, что это отличие неодинаково для разных фотографических материалов. Например, в табл. 8 приведена выдержка при съемке ультрафиолетовой флуоресценции биологического объекта на разных материалах при одинаковых условиях съемки.

Из таблицы видно, что для достижения одной и той же плотности негатива при съемке на пластинках Астро требуется такое же время, что и при съемке на пластинках Гиперпан, хотя чувствительность последних гораздо выше чувствительности первых, а пластинки для научных целей (S=96 ед. ГОСТа) оказались гораздо менее выгодными, чем пластинки Астро.

ТАБЛИЦА 8

Выдержки при фотографировании объекта в лучах ультрафиолетовой флуоресценции

Наименование фотоматериалов	$S_{0,2}$ ед. ГОСТа	Выдержка для получения определений плотности негатива, мин.
Пластинки		
Спектральные, тип 2	22	20
«Астро»	40	6
Для научных целей	96	15
Гиперпан	210	6
Пленки		
А-500	70	3
Изопанхром 17	130	48
А-2	180	22
КН-4	350	26

Следовательно, явление невзаимозаместимости следует учитывать при выборе фотографических материалов для микрофотографических работ, так как в практике микрофотографии встречаются случаи фотографирования как очень ярких объектов, осуществляемые с кратковременными выдержками (например, импульсная микрофотография движущихся живых объектов), так и чрезвычайно слабых по яркости объектов (например, при фотографировании микропрепаратов в свете их флуоресценции, методом темного поля).

В последнее время промышленно стали изготавливаться фотографические материалы с сильно «сглаженной» изоопакой, т. е. со слабо выраженным явлением невзаимозаместимости. К таким материалам относятся, например, астрономические пленки А-500, А-600 и А-700, пригодные для съемок объектов чрезвычайно низкой яркости, производящихся с большими выдержками. Изоопаки для некоторых видов фотоматериалов приведены в гл. V.

К явлению невзаимозаместимости близок другой фотографический эффект, называемый *явлением прерывистого действия света*. Это явление заключается в том, что одно и то же количество освещения производит различное фотографическое действие при его непрерывном и прерывистом освещении и зависит от степени прерывания освещения светочувствительного слоя темновыми паузами.

В практике микрофотографии с этим явлением сталкиваются очень редко.

Зернистость фотографического материала

Почернение фотографического слоя имеет зернистую структуру, которую можно обнаружить при лупном увеличении или даже невооруженным глазом. Природа зернистости изображения состоит в том, что в процессе проявления фотографического слоя микрокристаллы галогенида серебра превращаются в зерна металлического серебра. Однако размеры проявленных зерен серебра настолько малы (2—3 мкм), что сами отдельные зерна не могут быть причиной видимой глазом зернистости проявленного изображения. Последняя обусловлена тем, что зерна серебра в проявленном

слое распределены неравномерно в разных плоскостях фотографического слоя и, кроме того, за счет слияния мелких зерен в крупные образуют большие скопления (агломераты). В изображении эти скопления в разных слоях видны как бы наложенными друг на друга, благодаря чему создается впечатление зернистости (рис. 111).

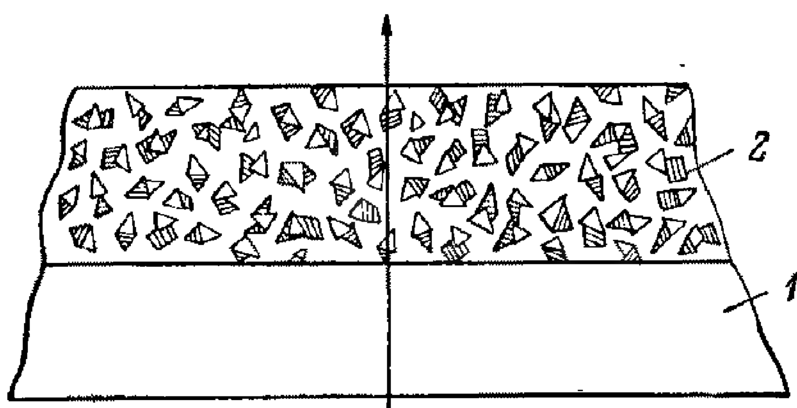


Рис. 111. Пояснение зернистости фотоэмульсии.

1 — подложка; 2 — эмульсионный слой.

Зернистость фотографического изображения определяется как исходной микрозернистостью фотографического слоя (т. е. размером эмульсионных кристаллов галоидного серебра), так и условиями проявления этого слоя. Чем выше плотность, которой воспроизведена деталь объекта, тем крупнее зернистость ее изображения, так как с ростом плотности на этом участке повышается количество отдельных зерен или их скоплений, перекрывающих друг друга. Эта характеристика фотографического слоя устанавливает верхний предел фотографического увеличения негатива, при котором на позитиве зернистость практически еще не заметна с расстояния наилучшего видения. Зернистость выражается обычно фактором зернистости $G=100/\beta_{\text{кр}}$, где $\beta_{\text{пр}}$ — наименьший масштаб изображения при фотопечати, полученного на данном фотографическом материале, для которого при определенной освещенности фотоотпечатка зернистость становится заметной. Например, фактор зернистости для пленки Фото 250 равен 25. Это означает, что для получения фотоотпечатка, зернистость которого не мешает рассматриванию полученного на нем изображения, допустимо 4-кратное увеличение с негатива, снятого на этой пленке.

Разрешающая способность фотографического материала

Разрешающая способность фотографического слоя $R_{\text{ф}}$ выражается максимальным числом раздельно передаваемых фотографическим слоем параллельных штрихов, приходящихся на 1 мм оптического изображения и имеющих одинаковую ширину с промежутками между ними. Разрешающая способность фотографических материалов зависит от их зернистости, количества рассеяния света в эмульсионном слое, условий химико-фотографической обработки материала. Разрешающая способность фотографических слоев сильно возрастает при переходе от экспонирования в видимой области спектра к экспонированию в ультрафиолетовую область. Это объясняется тем, что в ультрафиолетовой области спектра сильно возрастает поглощение света эмульсионным слоем, в результате чего уменьшается рассеяние света. Разрешающая способность фотографических материалов средней и низкой чувствительности находится в пределах 90—110 лин/мм, материалов высокой чувствительности — 70—85 лин/мм. Из фотографических слоев, обладающих высоким разрешением, следует отметить пленки Изопанхром 18 (R=250 лин/мм), Микрат 200 (R=200 лин/мм), Микрат 300 (R=300 лин/мм).

Разрешающая способность фотографических материалов всегда превышает размеры изображения разрешаемых микроскопом частиц и не ставит никаких ограничений при выборе фотографического материала для микрофотографических работ.

Для иллюстрации этого положения подсчитаем наименьший размер разрешаемых микроскопом фотографируемых микрочастиц. Этот случай соответствует фотографированию в ультрафиолетовых лучах (например,

$\lambda=265$ нм) и применению объектива высокой апертуры (например, объектива 70×1.0) и окуляра наименьшего увеличения ($3^\times$)

$$\delta=0.61\frac{\lambda}{A}=\frac{0.61\cdot0.265}{1.0}\approx0.16 \text{ мкм.}$$

Размер этих структур в плоскости фотографического материала равен $0.16\times70\times3=29.6$ мкм. Если разрешающая способность фотографического материала равна 100 лин/мм, то такой материал передаст раздельными структуры, имеющие в плоскости материала размер 10 мкм, т. е. гораздо меньше, чем их размер в плоскости фотографического слоя.

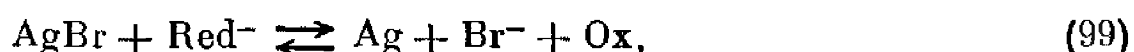
2. ОБРАБОТКА ФОТОГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Проявление

Вслед за экспонированием фотографического слоя, в результате которого в нем образуется скрытое изображение, следует его проявление, в процессе которого мельчайшие частицы металлического серебра, из которых состоит скрытое фотографическое изображение, увеличиваются в сотни тысяч раз; в результате этого скрытое фотографическое изображение значительно усиливается и превращается в видимое изображение.

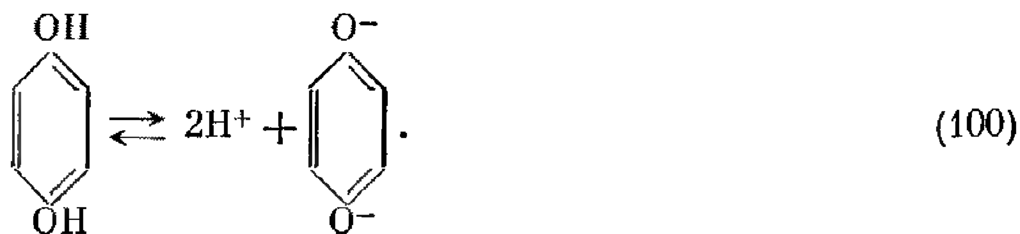
От процесса проявления существенно зависит и светочувствительность фотографического материала и качество получаемого изображения. Правильно подобранная рецептура проявителей и оптимальные условия проявления могут значительно повысить эффективность процесса обработки материала. В связи с чрезвычайно большим разнообразием фотографических материалов и их различиями по светочувствительности, зернистости, контрастности для достижения оптимальных результатов при их обработке необходимо применять наиболее целесообразные в каждом конкретном случае проявители и режимы обработки. Это определяется также различными требованиями, предъявляемыми к проявлению разных фотографических материалов. Например, при проявлении негативных материалов основным требованием является достижение высоких значений светочувствительности без повышенной зернистости получаемого изображения. Для позитивных материалов основным является получение желаемого контраста изображения при минимально возможной вуали без предъявления особых требований к светочувствительности.

Процесс проявления заключается в избирательном химическом восстановлении засвеченного при фотографировании галоидного серебра эмульсии в металлическое:

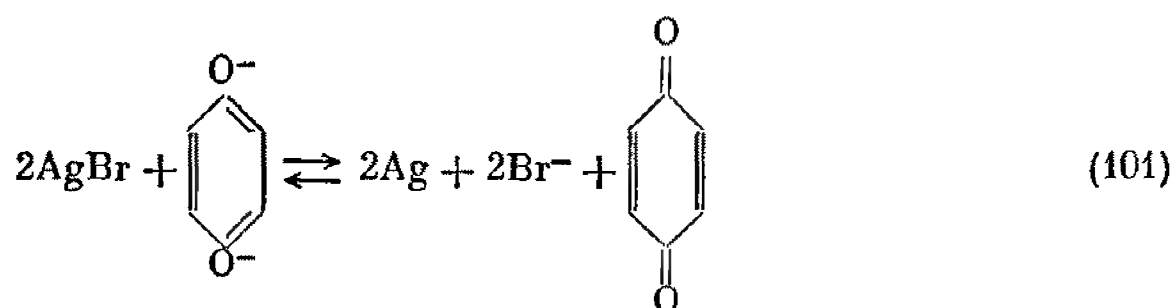


$$AgBr + Red^- \rightleftarrows Ag + Br^- + Ox, \qquad (99)$$

где Red^- — отрицательные ионы проявляющего вещества, обладающие большей восстановительной способностью, чем соответствующие молекулы, Ox — окисленная форма проявляющего вещества. В качестве конкретного примера здесь приводится восстановление бромистого серебра эмульсии одним из наиболее распространенных проявляющих веществ — гидрохиноном. В водном растворе гидрохинон диссоциирует на положительные ионы водорода и отрицательные ионы гидрохинона, которые и обладают восстанавливающим (проявляющим) действием:



Таким образом, восстановление бромистого серебра может быть выражено следующей схемой:



$$2AgBr + C_6H_4O_2^{--} \rightleftarrows 2Ag + 2Br^- + C_6H_4O_2 \quad (101)$$

В реакции (99) в случае гидрохинона в качестве проявляющего вещества действует ион гидрохинона $C_6H_4O_2^{--}$, а Ох соответствует молекула хинона $C_6H_4O_2$. Таким образом, гидрохинон, восстанавливая бромистое серебро до металлического, окисляется до хинона.

Проявители обычных типов для черно-белых материалов содержат следующие четыре основных компонента.

Проявляющее вещество. Наиболее распространенными являются производные бензола и пиразолона. К первым относятся, например, гидрохином, метол, парааминофенол, глицин, амидол, ко вторым — ряд веществ, самым распространенным из которых является фенидон.

Сульфит натрия (Na_2SO_3) играет в проявителе двоякую роль: во-первых, он предохраняет проявитель от быстрого окисления кислородом воздуха, во-вторых, служит для поддержания в растворе небольших постоянных концентраций окисленной формы проявляющего вещества, что необходимо для обеспечения обратимой реакции проявления. Например, при использовании в качестве проявляющего вещества гидрохинона сульфит вступает во взаимодействие с хиноном и кислородом воздуха, образуя вещество, которое, так же как и гидрохинон, обладает проявляющей способностью. Щелочной раствор проявителя без сульфита чрезвычайно быстро (в течение нескольких часов) теряет свои проявляющие свойства, приобретая темную окраску. Сульфит натрия бывает двух видов — безводный и кристаллический. При замене безводного сульфита на кристаллический последнего следует брать в два раза больше, чем безводного. Кристаллический сульфит менее удобен, так как при неправильном хранении он выветривается, т. е. теряет кристаллизационную воду, и одновременно может окисляться в сульфат натрия. По этой причине его следует сохранять в герметически закупоренной посуде.

Щелочь в проявителе служит для поддержания при проявлении необходимого значения pH проявляющего раствора, обеспечивающего достаточную концентрацию активной формы проявляющего вещества, а следовательно, и достаточную скорость проявления. Из равенства (100) видно, что при диссоциации молекул проявляющего вещества (гидрохинона), в результате которой получаются обладающие проявляющим действием отрицательные ионы гидрохинона, образуются также ионы водорода H^+. Увеличение pH раствора, достигаемое прибавлением в проявляющий раствор щелочи, ведет к смещению вправо химического равновесия, т. е. к увеличению концентрации отрицательных ионов гидрохинона и, таким образом, к увеличению скорости реакции проявления. Большинство проявляющих веществ (в том числе и гидрохинон) без наличия щелочи в растворе вообще не обладает проявляющим действием, некоторые (метол, парафенилендиамин) проявляют в отсутствие щелочи, но очень медленно. В качестве щелочи в проявляющих растворах применяются едкие щелочи (KOH, $NaOH$) или, значительно чаще, сода Na_2CO_3, поташ K_2CO_3, бура $Na_2B_4O_7$.

Связывая ионы водорода, щелочь в процессе проявления расходуется. Если проявляющий раствор обладает высокой кислотно-основной буферностью, то величина pH раствора в процессе проявления не меняется и,

следовательно, проявитель не меняет (или меняет в малой степени) свои свойства. Если же проявляющий раствор обладает малой буферностью, то в процессе проявления он быстро истощается. Так, полностью диссоциирующие едкие щелочи, создают высокие pH, поэтому они применяются для скоростных проявителей, но pH последних быстро снижается в процессе обработки, вследствие чего проявитель истощается. Слабо диссоциирующая бура применяется в медленно работающих и хорошо сохраняющихся проявителях. Наиболее применяемые в качестве щелочи сода и поташ занимают промежуточное положение. Углекислый натрий, или сода, встречаются в двух видах — кристаллическая и безводная сода. Соотношение количеств кристаллической и безводной соды в проявителе 2.7 : 1. Кристаллическая сода выветривается на воздухе, поэтому ее необходимо хранить в плотно закупоренной посуде. Так называемая кальцинированная сода представляет собой безводную соду. В случае замены в проявителе соды поташом следует брать вместо одной части безводной соды 1.3 части поташа.

Противовуалирующим веществом чаще всего служит бромистый калий. Его действие, как это следует из химического равновесия (99), сводится к торможению процесса проявления вследствие соответствующего уменьшения в растворе содержания металлического серебра. Так как тормозящее действие бромистого калия в первую очередь направлено на малые плотности изображения, т. е. на те участки фотографического слоя, где свет не действовал, то в случае малых концентраций бромистого калия в проявителе уменьшается только скорость проявления вуали, но не изображения. С увеличением концентрации бромистого калия в растворе его тормозящее действие распространяется и на большие плотности изображения, что в конечном итоге понижает чувствительность фотографического материала.

Помимо бромистого калия, в последнее время в качестве противовуалирующих веществ стали применяться некоторые органические вещества, наибольшее распространение среди которых получили бензотриазол и его производные, обладающие сильным противовуалирующим действием и применяющиеся для проявления слоев с большой вуалью. Концентрация бензотриазола должна быть приблизительно равна 0.1 г. на 1 л проявителя. В больших концентрациях бензотриазол может вызывать значительное понижение светочувствительности фотографического материала. При меньших pH бензотриазол действует эффективнее, чем при больших.

Следует отметить, что скорость проявления существенно зависит от температуры проявителя. Например, увеличение температуры метол-гидрохинонового проявителя Чибисова с 15 до 25° С увеличивает скорость проявления в 2 раза. Но при повышении температуры обрабатывающих растворов (выше 25° С) фотослой сильно набухает и размягчается. Такой слой очень непрочен и восприимчив к механическим воздействиям. Поэтому температура проявляющего раствора обычно поддерживается равной 20° С.

Величина практически достигаемой светочувствительности фотографического материала определяется не только свойствами самого материала, но и условиями его проявления. При проведении негативного процесса весьма важно выбрать условия проявления, при которых не происходит потери светочувствительности. Светочувствительность материала значительно изменяется с увеличением продолжительности проявления, вначале возрастает быстро, затем медленнее, достигая максимального значения, после чего начинает уменьшаться. Максимальная чувствительность достигается приблизительно при той же продолжительности проявления, при которой достигается и максимальный коэффициент контрастности (рис. 112). Однако в практике негативного процесса проявление часто ведут не до максимальной величины коэффициента контрастности, а прекращают его при меньших значениях γ, так как при этом возрастает широта фото-

материала и существенно уменьшается зернистость и вуаль. Число светочувствительности материала, указываемое на его упаковке или в справочнике, соответствует рекомендуемому значению коэффициента контрастности ($\gamma_{рек}$) для каждой группы фотографических материалов.

Ниже приводятся рецепты некоторых наиболее распространенных проявителей.

Для обработки черно-белых фотографических материалов наибольшее распространение получили метол-гидрохиноновые проявители.

Метол-гидрохиноновый проявитель Чибисова, контрастный

Метол	1 г
Гидрохинон	5 г
Сульфит натрия безводный	26 г
Сода безводная	20 г
Бромистый калий	1 г
Вода	До 1 л

Время проявления при 20°С: негативных материалов 6—8 мин., репродукционных и диапозитивных пластинок и позитивных пленок 4 мин., фотобумаги — 2 мин.

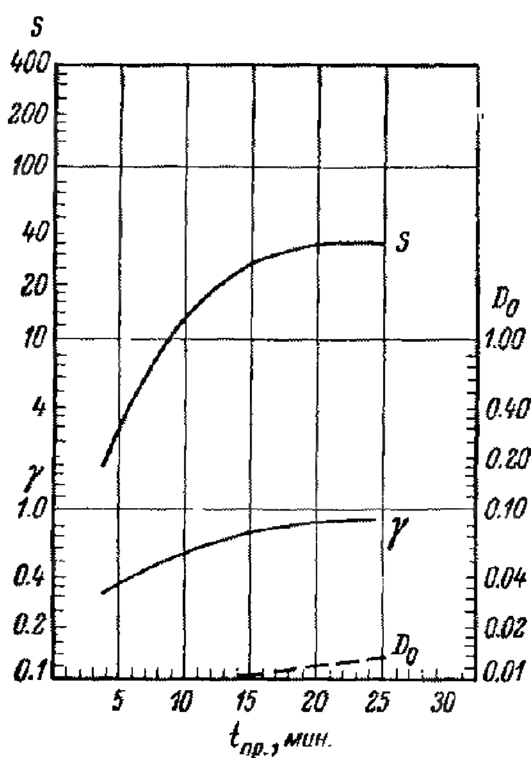


Рис. 112. Кривые кинетики проявления.

Растворение веществ, входящих в состав проявителя, обычно ведут в последовательности, соответствующей порядку этих веществ, указанному в рецепте проявителя. При приготовлении проявителя следует растворять сначала проявляющее вещество и сульфит и лишь после этого прибавлять щелочь. Если щелочь прибавить раньше сульфита, может произойти быстрое окисление проявляющего вещества. При применении в качестве проявляющего вещества метола (например, проявитель Чибисова), быстро окисляющегося на воздухе, рекомендуется сначала растворить небольшое количество сульфита ($\sim 1/_{10}$ часть), затем растворить метол и остальной сульфит. Всю порцию сульфита растворять сразу нельзя, так как растворимость метола при большой концентрации сульфита очень мала. Если проявитель предполагается хранить долгое время, то рекомендуется приготовлять его в двух растворах: в первом обычно содержится проявляющее вещество и сульфит, во втором — щелочь и бромистый калий. Перед проявлением составляется рабочий раствор. Для микрофотографических работ этот контрастный проявитель является самым распространенным; он применяется для проявления пластинок, позитивной пленки, форматных пленок, некоторых узких пленок, а также для проявления бумаги при фотографической печати микрофотоснимков. Часто в этом проявителе с целью получения высокого контраста изображения обрабатываются также кинопленки сравнительно небольшой светочувствительности (КН-1, МЗ и т. д.). Недостатком проявления последних пленок в проявителе Чибисова является сравнительно высокая зернистость полученных негативов, не позволяющая достигать значительных масштабов увеличений с этих негативов.

Метоловый проявитель, мелкозернистый

Метол	7.5 г
Сульфит натрия безводный	100 г
Вода	До 1 л

Время проявления при 20° С 20 мин. Проявитель применяется в основном для проявления малоформатных, особенно высокочувствительных (а следовательно, крупнозернистых) пленок и позволяет получать мягкие мелкозернистые изображения исследуемых объектов.

Фенидон-гидрохиноновый проявитель, мелкозернистый

Сульфит натрия безводный	100 г
Гидрохинон	5 г
Бура кристаллическая	3 г
Борная кислота кристаллическая . . .	3.5 г
Бромистый калий (10%-й раствор) . .	10 мл
Фенидон	0.2 г
Вода холодная	До 1 л

Среднее время проявления при 20° С от 12 до 16 мин. Энергично действующий, мелкозернистый проявитель, существенно повышающий (в 2 раза) светочувствительность негативного материала, что делает его весьма ценным для обработки сильно недодержанных негативов. Фенидоновый проявитель обладает меньшей зависимостью скорости проявления от pH и накопления бромистого калия, благодаря чему он обладает более высоким постоянством свойств и равномерностью проявления, чем проявители с метолом. Применяется в основном для проявления негативных пленок.

Метол-гидрохиноновый проявитель, выравнивающий

Метол	2 г
Сульфит натрия безводный	50 г
Гидрохинон	5 г
Бура кристаллическая	20 г
Вода холодная	До 1 л

Среднее время проявления при 20° С 15 мин. Выравнивающие проявители содержат малое количество щелочи или слабую щелочь (например, буру). Вследствие этого в сильно экспонированных участках изображения проявитель быстро истощается в результате уменьшения величины pH и проявление в этих участках замедляется и протекает неполностью. В слабо экспонированных участках проявитель расходуется в небольшом количестве, вследствие чего он не истощается и его оказывается достаточно для полного проявления структур изображения. Это приводит к уменьшению больших плотностей почернения изображения и, следовательно, к смягчению контраста изображения. Проявитель применяется для проявления контрастных негативов.

Следует отметить, что мелкозернистые проявители также обладают выравнивающими свойствами. Понижение зернистости при применении таких проявителей объясняется существенным понижением значений больших плотностей негативного изображения.

Фиксирование

В проявленном фотографическом слое наряду с металлическим серебром остается галоидное серебро, не подвергшееся экспонированию при фотографировании и сохраняющее чувствительность к свету. Это галоидное серебро удаляется из слоя в процессе его фиксирования. Фиксирование производится путем обработки фотографического слоя раствором соли, образующей с галоидным серебром растворимую в воде комплексную соль, удаляемую из слоя при последующей промывке. В фотографии в качестве фиксирующего вещества почти исключительно применяется тиосульфат натрия (гипосульфит) $Na_2S_2O_3$.

В качестве фиксирующего раствора можно применить водный раствор одного тиосульфата нартия. Часто применяют следующий раствор:

Тиосульфат натрия кристаллический . .	250 г
Вода холодная	До 1 л

С повышением концентрации тиосульфата натрия до 40% раствора скорость фиксирования повышается, с дальнейшим увеличением концентрации скорость фиксирования начинает уменьшаться.

Такой фиксаж употребляется сравнительно редко, так как он, взаимодействуя с продуктами окисления проявляющего вещества, легко окрашивается сам и постепенно начинает окрашивать желатину слоя фотографического материала. Кроме того, он быстро обогащается щелочью проявителя, что вызывает набухание желатины фотографического слоя и приводит поэтому к уменьшению его механической прочности. Наконец, повышение щелочности используемого фиксажа (сам фиксаж имеет слабощелочную реакцию) приводит к тому, что помещенный в него фотографический материал продолжает параллельно с фиксированием еще и проявляться, в результате чего образуется дополнительная вуаль. Поэтому значительно более надежным по сравнению с простым фиксажем являются кислые фиксирующие растворы. Кислый фиксаж представляет собой раствор гипосульфита, в котором величина pH снижена добавлением кислоты или соли (последняя в результате гидролиза образует кислоту).

Часто, особенно в теплую погоду, а также при использовании для накатки фотоотпечатков электрических глянцевателей в целях устранения чрезмерного набухания желатины эмульсионного слоя и связанного с ним уменьшения его механической прочности применяют кислые дубящие фиксажи, для чего в фиксаж добавляют алюминиевые или хромовые квасцы:

Кислый дубящий фиксаж

Тиосульфат натрия кристаллический .	250 г
Сульфит натрия безводный	15 г
Уксусная кислота (30%-й раствор) . .	45 мл
Алюмокалиевые квасцы	15 г
Вода холодная	До 1 л

Тиосульфат натрия должен быть растворен прежде добавления остальных веществ, иначе неизбежно выпадение из раствора серы. Уксусная кислота вводится лишь после растворения сульфита. Затем при перемешивании раствора к нему прибавляют предварительно приготовленный раствор квасцов в воде.

В заключение приводится рецепт быстродействующего фиксажа:

Тиосульфат натрия кристаллический .	200 г
Хлористый аммоний	40 г
Вода холодная	До 1 л

Процесс фиксирования состоит из двух стадий: 1) растворения галоидного серебра с образованием комплексных солей, растворимых в воде, и 2) удаление этих солей из желатинового слоя. Окончание первой стадии можно установить по осветлению негатива — исчезновению из слоя всех видимых следов молочно-мутного галоидного серебра, негатив становится прозрачным. После этого нужно дать возможность образовавшимся растворимым солям серебра диффундировать из слоя. Так как продолжительность каждой из указанных стадий фиксирования примерно одинакова, то практическое правило для определения времени фиксирования негатива заключается в следующем: время фиксирования негатива равняется удвоенному времени осветления.

Время фиксирования отпечатков равно примерно 10—15 мин.

Температура фиксирующего раствора должна быть равна приблизительно 20° С.

После проявления фотографических слоев перед фиксированием следует их споласкивать в воде; назначение этой промывки — предохранение фиксажа от следов проявителя, которые могут приводить к ухудшению свойств фиксирующего раствора.

После фиксирования следует окончательная промывка, имеющая целью удаление из слоев растворимых солей тиосульфата натрия с серебром и самого тиосульфата. Промывка должна быть довольно продолжительной (15—20 мин. в проточной воде) — до полного удаления из фотографического слоя всех растворимых солей тиосульфата. В противном случае изображение может быть впоследствии испорчено.

Усиление и ослабление изображения

Усиление применяется для увеличения плотности изображения недопроявленных или несколько недодержанных негативов. Следует иметь в виду, что в процессе усиления не могут быть выявлены детали, отсутствующие на первоначальном негативе. Процесс усиления позволяет не только увеличить общую плотность негатива, но также повысить его контраст и тем самым выявить слабо заметные детали на негативе.[1] Можно отметить, что при усилении происходит также и возрастание вуали, поэтому завуалированные негативы подвергать этому процессу нецелесообразно. В таких случаях рекомендуется путем предварительного ослабления уменьшить вуаль этого негатива (см. ниже), а затем применить усиление. По характеру изменения плотностей исходного изображения усилители делятся на пропорциональные, сверхпропорциональные и субпропорциональные.

Пропорциональное усиление применяется чаще всего. Оно характеризуется тем, что все плотности изображения увеличиваются в одно и то же количество раз. Коэффициент контрастности увеличивается во столько же раз, во сколько увеличиваются плотности. Типичным для этого вида усилителей является усилитель с двухромовокислым калием и соляной кислотой:

Двухромовокислый калий	8 г
Соляная кислота концентрированная .	6 мл
Вода	До 1 л

В этом растворе при температуре от 18 до 21° С негатив отбеливается (если усилению или ослаблению подвергается высохший негатив, то его следует предварительно размочить в воде в течение получаса). Процесс отбеливания считается законченным, когда при рассматривании негатива на просвет изображение не станет совершенно белым. После этого негатив промывают в течение 5 мин. в воде. Затем отбеленный негатив проявляется в любом энергично действующем проявителе, но с небольшим содержанием сульфита (например, проявителе Чибисова). Проявленный негатив ополаскивается, фиксируется в течение 5 мин. и промывается. Для достижения более высокой степени усиления весь процесс можно повторить. С химической точки зрения первая стадия процесса усиления заключается в отбеливании изображения, в результате чего металлическое серебро

[1] Контраст негатива можно повысить также в результате процесса контратипирования, т. е. получением фотографической печатью с данного негатива промежуточного позитива, а затем дубль-негатива.

изображения переходит в галоидное серебро. Во второй стадии процесса — проявлении — галоидное серебро снова восстанавливается до металлического и, кроме того, на участках изображения откладываются также трудно растворимые окрашенные соединения хрома, тем самым создавая дополнительные оптические плотности, вызывающие эффект усиления. Обработанные в этом усилителе негативы хорошо сохраняются, зернистость их при усилении увеличивается незначительно. Недостаток его — небольшая степень усиления — около 40%. К пропорциональным усилителям относится также и хинон-тиосульфатный усилитель, хранящийся обычно в трех растворах:

Запасный раствор № 1

Вода дистиллированная (комнатной температуры)	200 мл
Серная кислота (10%-й раствор) . . .	100 мл
Двухромовокислый калий	7.5 г
Вода дистиллированная	До 335 мл

Запасный раствор № 2

Вода дистиллированная (комнатной температуры)	250 мл
Метабисульфит калия	1.3 г
Гидрохинон	5 г
Вода дистиллированная	До 335 мл

Запасный раствор № 3

Вода дистиллированная (комнатной температуры)	250 мл
Тиосульфат натрия кристаллический .	7.5 г
Вода дистиллированная	До 335 мл

Рабочий раствор

Запасный раствор № 1	1 часть
Запасный раствор № 2	2 части
Запасный раствор № 3	2 »
Запасный раствор № 1	1 часть

Очередной запасный раствор надо вливать в смесь медленно при непрерывном помешивании и только после полного смешения ранее влитых растворов. Сохраняемость рабочего раствора в готовом виде незначительна, и поэтому его следует составлять, как правило, непосредственно перед употреблением. Процесс усиления начинается немедленно после погружения негатива в рабочий раствор и выражается в том, что изображение приобретает коричневую окраску. Степень усиления контролируется при извлечении негатива из раствора и рассматривания его, например, на фоне ярко освещенного листа белой бумаги. Обычно максимально возможное усиление достигается примерно в пределах 10 мин. Усиленный негатив промывается до полного просветления совершенно прозрачных мест изображения, что достигается обычно при промывке в проточной воде за 22—25 мин. Рабочий раствор используется только один раз. Хинон-тиосульфатный усилитель дает очень большое увеличение эффективной плотности (до 900%), поэтому он особенно пригоден для усиления слабых изображений. При применении этого усилителя сильно повышается контраст изображения и увеличивается его зернистость.

Сверхпропорциональный усилитель увеличивает сильнее плотность тех участков изображения, которые получили большую экспозицию. Слабо экспонированные участки изображения усиливаются слабее. Усиление этого типа приводит к большому возрастанию γ и D_{max}. Оно чаще всего применяется для штриховых изображений. Обычно применяется следующий сверхпропорциональный усилитель:

Раствор № 1

Сернокислая медь	5 г
Бромистый калий	5.5 г
Вода	200 мл

Раствор № 2

Азотнокислое серебро	10 г
Вода	200 мл
Аммиак — несколько капель	

Раствор № 3

Сульфит натрия кристаллический . .	5 г
Вода	100 мл

Раствор № 4

Какой-либо проявитель . . . .

Отбеливание производится в первом растворе, затем негатив недолго промывают (1—2 мин.) во избежание растворения бромистой меди. После промывки негатив помещают в раствор азотнокислого серебра, вновь промывают и погружают на несколько минут в раствор сульфита натрия. Затем негатив промывается, обрабатывается проявителем и снова промывается. Усилитель обеспечивает очень интенсивное усиление.

Субпропорциональное усиление, характеризующееся тем, что малые плотности увеличиваются непропорционально больше средних и больших, применяется относительно редко. Контраст изображения при таком усилении изменяется незначительно или вовсе не изменяется. К этому типу усилителей относится урановый усилитель.

Ослабление заключается в уменьшении оптической плотности изображения путем удаления из слоя некоторого количества серебра. Веществом, переводящим металлическое серебро в растворенную соль, служит обычно красная кровяная соль. Соединение последней с серебром растворимо в тиосульфате натрия. Ослаблению обычно подвергают такие перепроявленные и переэкспонированные негативы, большие плотности которых затрудняют фотографическую печать. В зависимости от характера ослабления плотностей изображения различают следующие типы ослабления:

Субтрактивное, или поверхностное, ослабление заключается в том, что серебро удаляется в одинаковой степени со всех деталей изображения, т. е. все плотности уменьшаются почти на одну и ту же величину. При таком ослаблении контраст изображения не изменяется или изменяется в очень незначительной степени. Субтрактивное ослабление применяется для исправления переэкспонированных негативов и для снятия общей или местной вуали. Наиболее распространенным является следующий субтрактивный ослабитель (ослабитель Фармера):

Раствор № 1

Вода	100 мл
Тиосульфат натрия	10 г

Раствор № 2

Вода	100 мл
Красная кровяная соль	10 г

Для работы берут 100 мл первого раствора и 8 мл второго. Растворы порознь сохраняются хорошо, смесь же их быстро разлагается, поэтому составлять ослабитель необходимо непосредственно перед употреблением. Как только смесь теряет свою желто-оранжевую окраску, действие ее ослабевает, необходимо добавить новую порцию красной кровяной соли. За ходом ослабления необходимо внимательно следить, периодически рассматривая негатив на просвет; по достижении желаемого почернения процесс прекращается и негатив промывают.

При пропорциональном ослаблении в большей степени ослабляется серебро в плотных частях изображения, в меньшей степени —

в малоплотных участках. Контраст изображения при этом уменьшается. Пропорциональное ослабление применяется для исправления перепроявленных изображений и выполняется, например, марганцево-персульфатным ослабителем.

Сверхпропорциональное (суперпропорциональное) ослабление характеризуется тем, что большие плотности изображения уменьшаются непропорционально сильнее малых, и применяется для ослабления контраста изображений (получаемых, например, съемкой контрастных объектов). Обычно пользуются следующим ослабителем этого типа:

Персульфат аммония	2 г
Серная кислота, 10%-й раствор	1.5 мл
Вода дистиллированная	До 100 мл

За процессом ослабления необходимо внимательно наблюдать, чтобы не допустить слишком большого уменьшения плотности. По окончании процесса негатив ополаскивают в воде и для прекращения ослабления помещают на несколько минут в 10%-й раствор сульфита натрия. Обработку заканчивают 10-минутной промывкой в воде.

Специальные методы обработки фотографических материалов

Так как эти методы еще совершенно не получили распространения в практике микрофотографических работ, то здесь приводятся очень краткие сведения о них. Более подробно с этими процессами можно ознакомиться в специальной литературе.

Быстрая обработка фотографических материалов усиленно начинает применяться в настоящее время для регистрации показаний различных приборов, получения кардиограмм и рентгеновских снимков, в аэрофотографии. Эти способы основаны на значительном ускорении проявления, достигаемом увеличением концентрации проявляющих веществ, pH (до 13—14), температуры проявления на 40—60° С и сокращением числа операций обработки путем объединения процессов проявления и фиксирования. Скоростной обработке подвергают материалы, имеющие тонкий эмульсионный слой (т. е. содержащий мало желатина) с малым количеством серебра. Кроме того, эмульсионный слой должен быть мелкозернистым и хорошо задублен, чтобы обработка могла вестись при высокой температуре. При небольшом ускорении процесса обработки (до 10 раз) разрешение и зернистость полученных изображений не ухудшаются.

Одноступенный фотографический процесс заключается в быстром получении позитивного фотоотпечатка одновременно с негативом. Негативный материал после его экспонирования вступает в контакт с позитивным материалом, поверхность которого предварительно покрывается тонким слоем проявляюще-фиксирующего раствора. Проявление негатива происходит за несколько секунд. В проявляюще-фиксирующем растворе находится также и тиосульфат натрия, который растворяет галоидное серебро негатива в количествах, обратно пропорциональных плотности деталей негативного изображения. При этом образуются комплексы тиосульфата натрия с серебром, диффундирующие в приемный слой позитивного материала, где они разрушаются с образованием металлического серебра, из которого и состоит позитивное изображение.

Проявление с обращением черно-белого негативного изображения в позитивное позволяет непосредственно получать позитивное изображение фотографируемого объекта. Его можно осуществить на любом светочувствительном материале, но лучшие результаты получаются на

специальных, так называемых обратимых пленках. Сущность процесса состоит в том, что после обычного проявления не проводится фиксирование, т. е. в фотографическом слое остается незасвеченное и соответственно непроявленное галоидное серебро. Из такого слоя специальным раствором (отбелкой) удаляют затем все восстановленное проявителем металлическое серебро. Если пленку вновь подвергнуть действию света, то оставшиеся зерна галоидного серебра при вторичном проявлении восстановятся в металлическое серебро, но при этом полученное фотографическое изображение будет позитивным. Это изображение по своему качеству не только не уступает, но даже несколько превосходит в отношении мелкозернистости позитив, напечатанный с данного негатива (без увеличения). Недостаток описанного способа состоит в том, что при этом можно получить только один экземпляр позитива. Кроме того, исключается возможность дополнительного увеличения данного позитива и исправления некоторых недостатков процесса съемки, что всегда возможно при наличии негатива.

3. ЦВЕТНЫЕ МНОГОСЛОЙНЫЕ ФОТОГРАФИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ И ИХ ОБРАБОТКА

Цветные многослойные фотографические материалы состоят из трех светочувствительных галоидносеребряных эмульсионных слоев (рис. 113): на первый слой (верхний) действует сине-фиолетовый свет, на второй (средний) — зеленый и желтый свет и на третий (нижний) — оранжевый и красный свет. Фильтровый слой задерживает синие и фиолетовые лучи для исключения их действия на средний и нижний слои. В каждом эмуль-

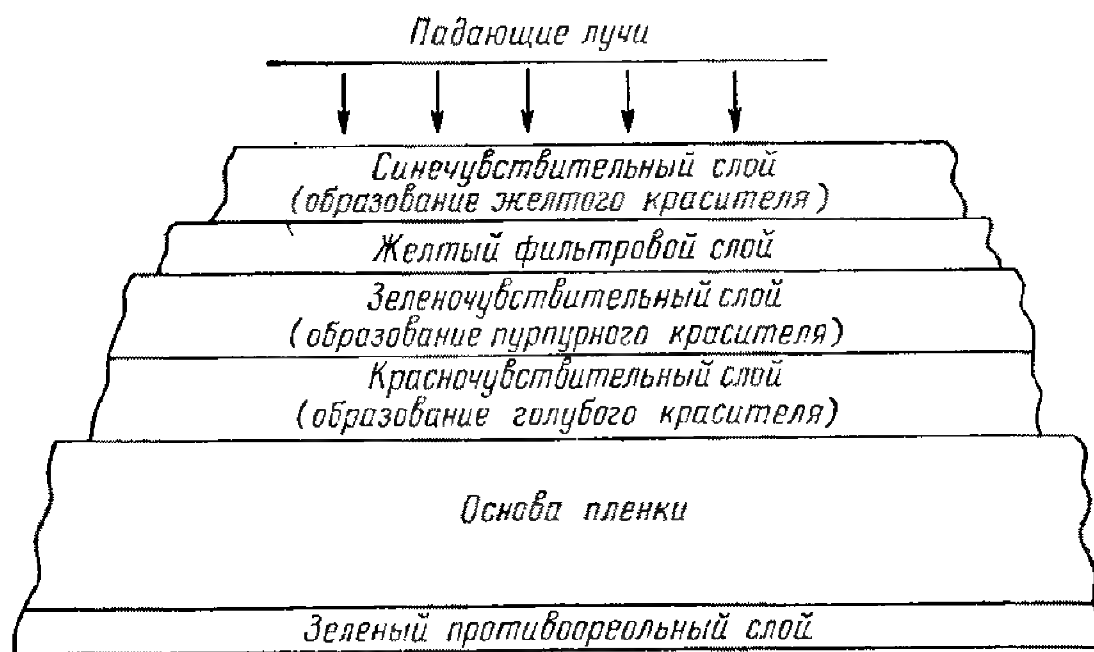


Рис. 113. Строение цветной многослойной пленки.

сионном слое содержится специальная краскообразующая компонента, которая в процессе химической обработки материала взаимодействует с продуктами окисления проявляющего вещества, образуя в каждом слое специфические красители (желтый — в верхнем слое, пурпурный — в среднем и голубой — в нижнем). Количество каждого красителя пропорционально количеству восстановленного серебра в соответствующем слое. При рассматривании проявленного негатива на просвет объект съемки воспроизводится в дополнительных цветах (дополнительным цветом к синему излучению является желтый, к зеленому — пурпурный, к красному — голубой). Аналогичным образом образуется позитивное изображение при печати с цветного негатива на цветной позитивный материал. В нем цвета изображения соответствуют цветам объекта. Цвет-

ные позитивные пленка и фотобумага в отношении расположения эмульсионных слоев имеют строение, аналогичное негативной фотопленке.

Так как фотографический процесс в цветных трехслойных материалах протекает в трех светочувствительных слоях, то свойства этих материалов должны выражаться тремя характеристическими кривыми почернения красителей. В современных цветных материалах всегда бывает то или иное расхождение характеристических кривых отдельных слоев, что является причиной их разбалансировки. Цветные негативные и позитивные материалы могут быть разбалансированы по светочувствительности, контрасту и величине вуали отдельных слоев. Поэтому при прямой печати с цветного негатива обычно не удается получить правильной передачи — в цветном позитивном изображении наблюдается преобладание того или иного цветового оттенка. Для компенсации небольшой разбалансировки трех слоев негативного материала по светочувствительности при фотографической печати на цветную бумагу применяются специальные коррекционные светофильтры.

Так как цветовой баланс изображения, полученного на цветных материалах, зависит как от светочувствительности отдельных слоев материала, так и от спектрального состава источника света, применяемого для фотографирования, то выпускаются негативные пленки для дневного и искусственного освещения. Кроме того, изготавливаются позитивные пленки, цветная пленка с обращением (для искусственного и дневного света), цветная фотобумага. Для улучшения цветопередачи и устранения цветоделительных искажений цветных пленок, обусловленных несовершенством спектрального поглощения применяемых красителей (образующихся в пленке при цветном проявлении), часто прибегают к внутреннему маскированию, применяя в слоях негативной пленки специальные маскирующие (окрашенные) компоненты, вводимые в состав эмульсии. После проявления негативов остаточные окрашенные компоненты образуют в фотографических слоях малоконтрастные позитивные изображения (маски), которые исправляют искажения и улучшают цветопередачу при печати позитивов на позитивную пленку или фотобумагу. Подробнее о свойствах этих материалов будет сказано в гл. V.

Преимуществом применения для фотографирования (в том числе и для микрофотографирования) цветных обратимых пленок по сравнению с негативными является то, что насыщенность и контраст цветов и резкость получаемых на них изображений существенно выше, чем на цветных отпечатках. Существовавший ранее недостаток обратимых пленок — невозможность непосредственного изготовления с них отпечатков — уже отпал, так как появились процессы, которые делают это возможным. [1] В случае получения с цветной негативной пленки позитива имеется возможность исправления ошибок, которые возникают в негативах при экспонировании и химической обработке фотоматериала, в том числе и исправление цветовых искажений (применением соответствующих корректирующих светофильтров). Недостатком получения позитива негативно-позитивным процессом является то, что цвета позитивного изображения по сравнению с позитивом на обратимых пленках обычно менее насыщены, а резкость изображения меньше.

Из свойств цветных фотографических материалов, которые имеют весьма существенное значение в микрофотографии, остановимся на фотографической широте этих материалов. Фотографическая широта каждого отдельного слоя цветного материала, так же как и черно-белых материалов, определяется разностью логарифмов экспозиций, отвечающих концу

---

[1] Ленинградская фабрика фотобумаг выпускает специальную цветную обращаемую бумагу для печати с обратимых цветных пленок.

и началу прямолинейного участка характеристической кривой. Каждый из слоев многослойного материала характеризуется своей широтой, причем в случае недостаточной согласованности слоев по светочувствительности эти проекции не накладываются друг на друга на всем своем протяжении. В этом случае, как следует из рис. 114, длина участков оси $\lg H$, в пределах которой все три характеристические кривые прямолинейны, т. е. величина общей фотографической широты материала в целом L, будет измеряться разностью $\lg H$ в конце прямолинейного участка наиболее чувствительного и в начале прямолинейного участка наименее чувствительного элементарных слоев. Естественно, что чем более разбалансирован фотографический материал по светочувствительности, тем меньше общая широта материала в целом. Таким образом, несбалансированность многослойного материала по светочувствительности свидетельствует о том, что этот материал следует экспонировать белым светом иного спектрального состава, чем тот, который для него рекомендован, или тот, которым фактически пользуются, не зная его спектрального состава. Таким образом, основное различие по широте между черно-белым и многослойным материалами состоит в том, что фотографическая широта черно-белого материала не зависит от спектрального состава освещения, а широта многослойного материала очень к нему чувствительна. Отсюда основное эксплуатационное отличие цветных многослойных материалов — при работе с ними нужно, кроме величины светового потока, знать его спектральный состав. Т. е. при цветной фотографии необходим строгий контроль цветовой температуры излучения. В противном случае будет наблюдаться уменьшение общей широты цветного материала, что приводит к меньшему интервалу применяемых для фотографирования выдержек, в пределах которого детали объекта будут как по плотности, так и по цвету переданы без искажений. Процесс химико-фотографической обработки цветных негативных материалов довольно сложен и включает следующие операции:

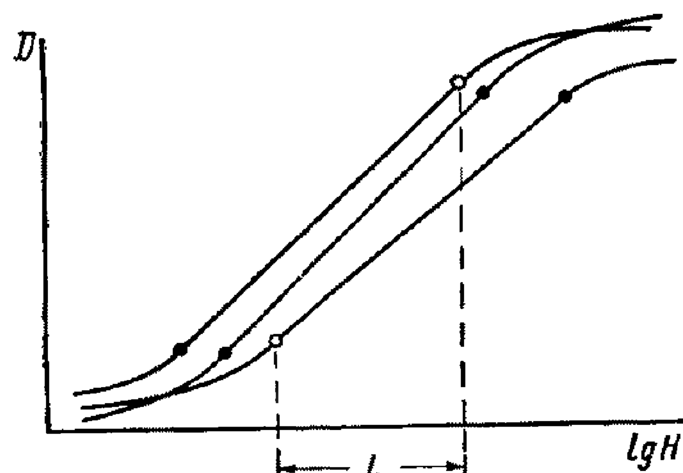


Рис. 114. Характеристические кривые трех слоев цветного фотоматериала и его широта.

1) Проявление, в результате которого в каждом эмульсионном слое пленки происходит восстановление экспонированных зерен галоидного серебра и образование красителей (в результате реакции цветной компоненты, входящей в каждый слой, с продуктом окисления проявляющего вещества). В качестве проявляющего вещества в цветных проявителях применяется диэтилпарафенилендиаминсульфат (ТСС) и этилоксиэтилпарафенилендиаминсульфат (Т-32). Необходимо помнить о токсичности этих веществ; они поражают кожный покров при попадании на него проявляющего вещества. Более сильное поражение вызывает диэтилпарафенилендиамин (ТСС), поэтому в проявителях для обработки фотобумаги применяется в большинстве случаев этиоксиэтилпарафенилендиамин, хотя он дает меньший цветовой контраст изображений.

Содержание сульфита в цветных проявителях (по сравнению с черно-белыми проявителями) небольшое, так как при большой концентрации сульфита выход красителей в реакции проявления значительно понижается. В связи с этим сохраняемость цветных проявителей значительно меньше, чем черно-белых. Для увеличения сроков хранения цветных проявителей в них обычно добавляется небольшое количество гидраксиламина. В качестве щелочи в цветном проявителе обычно применяется

поташ. Бромистый калий в цветном проявителе, так же как и в черно-белых, используется для понижения вуали. При значительной вуали пленок в проявитель рекомендуется добавлять также бензотриазол (3—4 мг на 1 л проявителя). Если проявитель составляется на недистиллированной воде, то в него следует добавить умягчители воды: динатриевую соль этилендиаминотетрауксусной кислоты (2 г на 1 л проявителя или гексаметафосфат натрия (4 г на 1 л проявителя). Так как цветной проявитель быстро окисляется на воздухе, его рекомендуется приготовлять и хранить в двух растворах.

2) Отбеливание заключается в растворении восстановленного при цветном проявлении серебра и коллоидного серебра желтого фильтрового слоя. Для отбеливания применяется обычно красная кровяная соль. Бромистый калий или хлористый натрий ускоряют процесс отбеливания серебряного изображения.

3) Фиксирование заключается в растворении нерастворенной части галогенидов серебра светочувствительных слоев и металлического серебра, окисленного в процессе отбеливания. Для фиксирования применяется 25%-й раствор тиосульфата натрия. При обработке цветных позитивных материалов после проявления их помещают в останавливающий раствор (стоп-ванну). При этом процесс проявления прерывается и труднорастворимое проявляющее вещество переводится в легкорастворимую соль; последняя удаляется при промывке фотографического материала перед отбеливанием, что предотвращает образование цветной вуали. Схема образования цветного изображения в негативном и позитивном процессах представлена на рис. 115. Ниже приведены режимы химико-фотографической обработки каждого вида указанных выше цветных материалов и рецепты растворов.

Цветной проявитель для обработки пленки

Раствор № 1

Гидроксиламин сернокислый (С-55)	1.2 г
Диэтилпарафенилендиаминсульфат (ТСС)	2.75 г
Вода дистиллированная	До 500 мл

Раствор № 2

Сульфит натрия безводный	2 г
Поташ	75 г
Бромистый калий	2.5 г
Вода дистиллированная[1]	До 500 мл

Цветной проявитель для обработки бумаги

Раствор № 1

Гидроксиламин сернокислый	2 г
Этилоксиэтилпарафенилендиаминсульфат (Т-32)	4.5 г
Вода дистиллированная	До 500 мл

Раствор № 2

Поташ	75 г
Сульфит натрия безводный	0.5 г
Бромистый калий	0.5 г
Вода дистиллированная	До 500 мл

---

[1] Растворение веществ всех растворов следует вести в последовательности, указанной в рецепте. Необходимый объем проявляющего раствора образуется смешиванием равных объемов растворов №№ 1 и 2 (второй раствор вливается в первый при размешивании).

Отбеливающий раствор

Красная кровяная соль	50 г
Бромистый калий (или хлористый натрий)	10 г
Вода	До 1 л

Останавливающий раствор

Фосфорнокислый калий однозамещенный	10 г
Фосфорнокислый натрий двузамещенный	10 г
Тиосульфат натрия	200 г
Вода	До 1 л

Фиксирующий раствор (для пленки и бумаги)

Тиосульфат натрия кристаллический	250 г
Вода	До 1 л

Режим химико-фотографической обработки

Операция	Продолжительность обработки, мин.	Температура раствора и воды, °C	Операция	Продолжительность обработки, мин.	Температура раствора и воды, °C
Цветная негативная пленка			*Цветная фотобумага*		
Цветное проявление	6	18±0.5	Цветное проявление	3	18±0.5
Промывка . . .	20	12±4	Промывка . . .	10	12±4
Отбеливание . .	5	17±2	Останавливающий раствор	5	17±2
Промывка . . .	5	12±4	Промывка . . .	5	12±4
Фиксирование . .	5	17±2	Отбеливание . .	5	17±2
Промывка . . .	20	12±4	Промывка . . .	5	12±4
			Фиксирование . .	5	17±2
Цветная позитивная пленка			Промывка . . .	20	12±4
Цветное проявление	11	18±0.5	*Цветная обратимая пленка*		
Останавливающий раствор	2	17±2	Черно-белое проявление . . .	35	18±0.5
Промывка . . .	15	12±4	Промывка . . .	30	12±4
Отбеливание	5	17±2	Засветка (лампа 500 вт на расстоянии 1 м) .	5	
Промывка . . .	5	12±4	Цветное проявление	11	18±0.5
Фиксирование . .	5	17±2	Промывка . . .	5	12±4
Промывка . . .	20	12±4	Отбеливание . .	5	17±2
			Промывка . . .	5	12±4
			Фиксирование . .	5	17±2
			Промывка . . .	20	12±4

Черно-белое проявление рекомендуется вести в энергично работающем амидоловом проявителе:

Амидол	5 г
Сульфит натрия безводный	50 г
Бромистый калий	1 г
Вода	До 1 л

Амидоловый проявитель быстро окисляется кислородом воздуха, поэтому его следует готовить непосредственно перед обработкой пленки.

Обработка обратимых пленок после операции засветки может производиться при комнатном освещении.

Указанными режимом и растворами можно обрабатывать также цветную пленку с обращением Орвоколор.

Температура растворов во время обработки цветных материалов и продолжительность отдельных операций существенно влияют на их фотографические свойства. Значительные отступления от указанных условий обработки могут вызвать неправильную цветопередачу на снимке, повышение температуры растворов может приводить к возрастанию вуали, пузырению и даже к сползанию эмульсионных слоев. В тех случаях, когда не удается сохранить температуру растворов в рекомендованных пределах, для предотвращения повреждения эмульсионных слоев целесообразно проводить дубление материала. С целью увеличения прочности эмульсионных слоев рекомендуется иногда добавлять в цветной проявитель или фиксаж сернокислый натрий из расчета до 150—200 г на 1 л цветного проявителя или фиксажа; но при этом следует иметь в виду, что добавление сернокислого натрия несколько изменяет цветовой баланс полученного изображения. Хорошие результаты дает дубление в одном из приводимых ниже дубящих растворов:

Раствор № 1

Хромовые квасцы кристаллические . .	40 г
Вода холодная	До 1 л

Раствор № 2

Формалин (40%)	40—50 мл
Бромистый калий кристаллический . .	10 г
Вода холодная	До 1 л

Экспонированный фотоматериал выдерживается в воде в течение 2—3 мин., затем обрабатывается в дубящем растворе (2—3 мин.), промывается в проточной воде (3—5 мин.) и подвергается дальнейшей обработке (цветному проявлению).

Образующаяся при дублении негатива цветная вуаль может быть устранена применением при печати на бумагу корректирующих светофильтров. Обратимые цветные пленки дубить не рекомендуется, так как образующаяся при дублении цветная вуаль, искажающая цветовой баланс позитива, не может быть устранена.

Обработка негативных и позитивных цветных пленок до процесса отбеливания и фотопечать осуществляются в темноте или при темнозеленом освещении (со светофильтрами № 169 или № 170); после начала отбеливания можно включать свет. Обработка цветной фотобумаги производится при использовании светофильтра № 166, после останавливающей ванны может проводиться при обычном освещении.

Основной недостаток обработки цветных материалов — большая длительность — несколько устраняется применением ускоренных процессов. Однако опыт показывает, что все ускоренные процессы обработки цветных материалов связаны с некоторым ухудшением качества цветовоспроизведения. Поэтому эти процессы не рекомендуется применять для негативных материалов, а допускаются только для массовой обработки отпечатков, изготовленных на цветной бумаге. Режимы и рецепты растворов ускоренного процесса НИКФИ приведены ниже.

Режим химико-фотографической обработки (ускоренный процесс НИКФИ)

Операция	Продолжительность обработки, мин.			Температура раствора и воды, °С
	негативная пленка	позитивная пленка	фотобумага	
Цветное проявление	4—5	8	2	18—19
Промывка	5—6	0.5—1	2—4	10—15
Фиксирование	5—7	5—7	2—3	14—19
Отбеливание (ослабление)	4	3—4	1—2	14—19
Конечная промывка	8—12	8—12	8—12	10—15

Цветной проявитель

Диэтилпарафенилендиаминсульфат	6 г
Сульфит натрия безводный	3.6 г
Гидроксиламин сернокислый	1.2 г
Поташ	80 г
Бромистый калий	2.5 г
Вода дистиллированная	До 1 л

Фиксаж

Тиосульфат натрия	250 г
Сульфит натрия безводный	25 г
Бисульфит натрия	4 г
Вода	До 1 л

Отбеливающие растворы

Красная кровяная соль	50 г
Вода	До 1 л

При обработке цветных позитивов нередко отбеливают и растворяют только часть серебра, в этом случае применяется рецепт:

Красная кровяная соль	10 г
Вода	До 1 л

В заключение параграфа приводятся режимы обработки негативных и позитивных пленок с маскирующими компонентами и новой цветной обратимой пленки ЦО-90Л.

Режим обработки цветной негативной пленки с маскирующими компонентами

Операция	Продолжительность обработки, мин.	Температура раствора и воды, °С
Проявление	5—7	20 ±0.3
Допроявление	5	20 ±0.3
Фиксирование	4—7	18 ±0.3
Промывка	10—12	11 ±3
Отбеливание	4	20 ±1
Промывка	5	11 ±3
Фиксирование	4	18 ±2
Промывка	15—25	11 ±3

Режим обработки цветной позитивной пленки ЦП-8

Наименование операций	Продолжительность обработки, мин.	Температура раствора и воды, °С
Проявление	8—10	20 ±0.3
Промывка	Не более 1	11 ±3
Фиксирование (I)	6—8	19 ±3
Промывка	10—12	11 ±3
Отбеливание	4	19 ±3
Промывка	3	11 ±3
Фиксирование (II)	4	19 ±3
Промывка	10—15	11 ±3

Рецепты растворов для обработки негативной пленки с маскирующими компонентами:

Проявитель

ТСС	2.3 г
С-55	1.2 г
Поташ	60.0 г
KBr	2.0 г
Сульфит натрия безводный	2.0 г
Вода дистиллированная	До 1 л
pH	10.5—10.7

Допроявитель

Метабисульфит натрия	1.9 г
Вода дистиллированная	До 1 л
pH	6.8—7.8

Фиксаж

Гипосульфит	200 г
Сульфит натрия безводный	5.0 г
Метабисульфит натрия	2.0 г
Вода	До 1 л
pH	6.5—6.9

Отбеливающий раствор

Красная кровяная соль	30.0 г
KBr	15 г
Калий фосфорнокислый однозамещенный	17 г
Вода	До 1 л
pH	4.5—5.5

Рецепты растворов для обработки позитивной пленки ЦП-8:

Проявитель

ТСС	2.8 ±0.1 г
С-55	1.2 г
Сульфит натрия безводный	2.0 ±0.2 г
Поташ	60 ±3.0 г
KBr	2.0 ±0.15 г
Вода дистиллированная	До 1 л
pH	10.55 ±0.15

Фиксаж I

Гипосульфит	200 ±15 г
Сульфит натрия безводный	5.0 г
Метабисульфит	2.0 г
Ледяная уксусная кислота	3.0 мл
Вода	До 1 л
pH	4.7 ±0.3

Фиксаж II

Гипосульфит	200 ±15 г
Сульфит натрия	5 г
Метабисульфит	2.0 г
Вода	До 1 л
pH	6.5—8.5

Отбелка

Красная кровяная соль	30 ±2 г
KBr	15 ±2 г
Вода	До 1 л
pH	6.3 ±0.7

Режимы химико-фотографической обработки цветной обратимой пленки ЦО-90Л

Наименование операций	Продолжительность обработки, мин.	Температура раствора, °С	Наименование операций	Продолжительность обработки, мин.	Температура раствора, °С
Черно-белое проявление	12	25 ±0.3	Цветное проявление	10	24 ±0.3
Сульфатная ванна	3	20 ±3	Промывка 3-я	20	12 ±3
Промывка 1-я	1	12 ±3	Отбеливание	5	20 ±1
Стоп-ванна	2	20 ±1	Промывка 4-я	5	12 ±3
Промывка 2-я	5	12 ±3	Фиксаж	5—7	20 ±1
Засветка (2 лампы по 300 вт на расстоянии 1 м с эмульсионной стороны пленки)	2		Промывка 5-я	15	12 ±3

Рецепты растворов для обработки пленки ЦО-90Л:

Черно-белый проявитель

Бура	15 г
Сульфит натрия безводный	40 г
Гидрохинон	4.2 г
Фенидон	0.25 г
Поташ	10 г
Бромистый калий	2 г
Роданистый калий	2 г
Иодистый калий	0.01 г
Вода	До 1 л

Сульфатный раствор

Магний сернокислый	20 г
Вода	До 1 л

Останавливающий раствор

Натрий уксуснокислый	15 г
Уксусная кислота ледяная	25 мл
Вода	До 1 л

Цветной проявитель

Такой же, как и для обработки остальных цветных пленок.

Отбеливающий раствор

Красная кровяная соль	100 г
Бромистый калий	35 г
Фосфорнокислый калий однозамещенный	5.8 г
Фосфорнокислый натрий двузамещенный	4 г
Вода	До 1 л

Фиксаж

Гипосульфит	160 г
Аммоний сернокислый	80 г
Вода	До 1 л

Вместо рекомендованного черно-белого проявителя можно также использовать стандартный проявитель АСП-3М:

Метол	5 г
Сульфит натрия безводный	50 г
Гидрохинон	6 г
Сода безводная	31 г
Бромистый калий	2 г
Бенозтриазол	0.1
Раствор иодистого калия	0.01 г/л
Вода	До 1 л

Глава V

ПРАКТИКА МИКРОФОТОГРАФИРОВАНИЯ

В главе излагаются общие сведения из практики микрофотографирования. Специфические вопросы применения фотографирования в биологии, металлографии, минералогии и других областях вынесены в главу VI.

1. ТРЕБОВАНИЯ К ОБЪЕКТАМ

Качество микрофотоснимка зависит как от грамотного выбора и использования аппаратуры и фотографических материалов, так и от строения и физико-химических свойств исследуемого объекта. От типа объекта, его толщины и свойств зависит выбор метода его исследования.

Так, тонкие прозрачные препараты могут изучаться методами темного поля, фазового или интерференционного контраста. Объекты, обладающие собственной флуоресценцией или окрашенные специальными флуоресцирующими красителями, исследуются с помощью люминесцентных микроскопов. Препараты со структурами, поглощающими в ультрафиолетовых лучах (к ним относятся большинство биологических объектов), могут исследоваться методами ультрафиолетовой микроскопии. Для изучения окрашенных объектов чаще всего применяется метод светлого поля в проходящем свете. Структуры непрозрачных препаратов (например, шлифов металлов, руд) могут изучаться в отраженном свете методами светлого и темного поля, фазового и интерференционного контраста, в свете флуоресценции и др. Анизотропные объекты рассматриваются и фотографируются в поляризованном свете.

Нельзя дать конкретных рекомендаций о выборе определенного метода исследования для данного препарата. В каждом случае выбор метода определяется исходя из особенностей структурной организации объекта, а также возможностей, преимуществ и недостатков каждого метода исследования. В некоторых случаях наибольшую информацию об объекте можно получить комбинированием различных методов.

Для иллюстрации возможностей основных видов микроскопии при исследовании одного и того же объекта приведены микрофотографии (рис. 116*).[1]

К препаратам, предназначенным для фотографирования, предъявляются повышенные требования. Шлифы металлов должны быть хорошо полированными и достаточно плоскими; шлифы минералов должны иметь одинаковую по площади толщину. В биологических объектах не допускается разрывов, сморщенности срезов, потеря составляющих

[1] Здесь и дальше номера рисунков со звездочками — микрофотографии, приведенные в конце книги.

эти объекты веществ при их фиксации, резке и окрашивании. Препараты должны быть достаточно тонкими, без существенных изменений толщины в пределах одного среза. Следует обращать также внимание на чистоту препаратов.

2. ВЫБОР ПАРАМЕТРОВ МИКРОСКОПА

Как уже говорилось, перед выбором параметров микроскопа, при которых предполагается провести фотографирование, экспериментатор должен уяснить, что за препарат находится у него, каким методом его надо исследовать, для какой цели нужна фотография. Не следует забывать также, какие возможности имеются в отношении аппаратуры, хотя речь о ней пойдет в следующем параграфе.

Если цель работы ясна и намечены пути ее решения, то естественно в первую очередь остановиться на выборе основных параметров прибора. Так как надо учитывать их все одновременно, то здесь полезно перечислить приведенные в первых двух главах формулы, связывающие параметры микроскопа, а именно:

разрешающая способность микроскопа: $\delta = \frac{0.61\,\lambda}{A}$,

полезное увеличение:

$$\beta_{\text{пол}} = \frac{\varepsilon p}{0.61\lambda} A = \left| \frac{(0.15 \div 0.30)}{0.61\lambda} A \right|_{\lambda=0.0005} \approx (500 \div 1000)\,A,$$

масштаб изображения:

$$\beta = V\Gamma_{\text{ок}} \frac{K}{p},$$

глубина резкого изображения:

$$T = T_{\Gamma} + T_{\text{В}} = \frac{\varepsilon p}{A\beta} + \frac{\lambda}{2A^2} = \left| \frac{0.15}{A\beta} + \frac{\lambda}{2A^2} \right|_{\beta=1000A} = \frac{0.8\lambda}{A^2},$$

освещенность изображения:

$$E = \pi\tau B \frac{A^2}{\beta^2},$$

поле зрения микроскопа:

$$d = \frac{L}{\beta},$$

где λ — длина световой волны, A — апертура микроскопа, V — увеличение объектива, $\Gamma_{\text{ок}}$ — увеличение окуляра, K — длина камеры, p — расстояние наилучшего видения, ε — острота зрения, τ — коэффициент пропускания оптической системы прибора, B — яркость источника света, L — диагональ фотокадра, T_{Γ} и $T_{\text{В}}$ — соответственно геометрическая и волновая глубина резкого изображения.

Надо отметить, что полезное увеличение и глубина резкого изображения определены исходя из условия, что микрофотография будет рассматриваться с расстояния наилучшего видения $p=250$ мм. При большем расстоянии указанные величины возрастают.

Так как на практике осветительная апертура A_0 выбирается, как правило, несколько меньше апертуры объектива A, то последнюю следовало бы, строго говоря, заменить на A_0 в выражении для освещенности и величиной $0.5\,(A+A_0)$ в формулах для определения разрешающей способности и полезного увеличения. Однако для простоты рассуждений здесь этого не сделано.

Все перечисленные параметры прямо или косвенно связаны между собой, так что изменение одного из них неизбежно влечет изменение и каких-то других. И это следует хорошо представлять себе, потому что, остановив свой выбор на определенной величине какой-то одной характеристики, можно столкнуться с таким фактом, что другие характеристики при этом будут совершенно не удовлетворять условиям опыта.

ТАБЛИЦА 9

Взаимосвязь основных параметров микроскопа

Аргументы (λ, A, V, $\Gamma_{ок}$, K) и их изменения	Функции и их изменения						
	δ	$\beta_{пол}$	β	$T_Г$	$T_В$	E	d
$q\lambda$	$q\delta$	$\frac{1}{q}\beta_{пол}$	β	$T_Г$	$qT_В$	E	d
qA	$\frac{1}{q}\delta$	$q\beta_{пол}$	β	$\frac{1}{q}T_Г$	$\frac{1}{q^2}T_В$	q^2E	d
qV	δ	$\beta_{пол}$	$q\beta$	$\frac{1}{q}T_Г$	$T_В$	$\frac{1}{q^2}E$	$\frac{1}{q}d$
$q\Gamma_{ок}$	δ	$\beta_{пол}$	$q\beta$	$\frac{1}{q}T_Г$	$T_В$	$\frac{1}{q^2}E$	$\frac{1}{q}d$
qK	δ	$\beta_{пол}$	$q\beta$	$\frac{1}{q}T_Г$	$T_В$	$\frac{1}{q^2}E$	$\frac{1}{q}d$

Изменение тех или иных характеристик прибора в зависимости от изменений исходных величин можно представить с помощью табл. 9. Если выбраны некоторые значения независимых друг от друга аргументов (первая строка таблицы), то им будут соответствовать определенные значения функций, подсчитанные по приведенным выше формулам. Увеличение какого-либо аргумента в q раз приводит к соответствующему изменению нескольких функций. Например, повышение разрешающей способности микроскопа путем увеличения апертуры неизбежно влечет уменьшение глубины резкого изображения и возрастание освещенности. Последнее, конечно, благоприятствует опыту, но уменьшение глубины явно нежелательно, а иногда и неприемлемо. Другой пример: удлинив камеру, можно увеличить масштаб изображения, но при этом уменьшается глубина, освещенность и поле зрения.

Эти примеры показывают, что, сталкиваясь на практике с подобными случаями (а такие бывают довольно часто), приходится идти на компромисс, т. е. выбирать какие-то средние значения характеристик, которые были бы оптимальными со всех точек зрения.

В том случае, когда масштаб изображения принимается равным полезному увеличению, возможности изменения глубины резкости и освещенности, естественно, сокращаются: глубина зависит только от длины волны и апертуры, а освещенность не зависит ни от масштаба изображения, ни от апертуры.

Интересно, что освещенность при таком ограничении будет пропорциональна квадрату длины волны. Отсюда следует, что при равномерной по спектру интенсивности излучения выгодней производить фотографирование в более длинноволновой области (так как в данном случае речь идет о работе при $\beta = \beta_{пол}$, то с увеличением длины волны при постоянной апертуре увеличивается масштаб изображения). Для ламп накаливания

выигрыш в освещенности при работе в красном свете будет еще больше, так как их яркость в этой области спектра выше, чем в синей. Все это не мешает знать тогда, когда сталкиваются с невыгодными в энергетическом отношении условиями (например, исследования по методу темного поля). Однако с увеличением длины волны ухудшается разрешающая способность. Чтобы сохранить ее неизменной, следует увеличить апертуру, но тогда уменьшается глубина резкого изображения. Таким образом, переход к более длинноволновой области спектра можно рекомендовать для объектов, элементы которых имеют размеры, превосходящие разрешающую способность. Разумеется, что речь идет о неокрашенном объекте. В случае окрашенных объектов спектральная область для работы подбирается, как будет показано ниже, исходя из других условий.

Обратив еще раз внимание на взаимосвязь всех параметров микроскопа, можно перейти к рассмотрению каждого их них в отдельности.

Разрешающая способность микроскопа, естественно, должна быть такой, чтобы на фотографии обеспечивалось достаточно четкое разделение изображений отдельных элементов структуры объекта. Качество фотографии значительно выигрывает, если разрешающая способность будет в 1.5—2 раза больше той, которая определена расчетным путем для данного объекта. Это приведет к тому, что изображения двух соседних элементов структуры окажутся полностью разделенными.

Разрешающая способность возрастает пропорционально увеличению апертуры и уменьшению длины волны света. При апертуре $A=1.3$ и длине волны $\lambda=0.5$ мкм разрешающая способность составляет $\delta=0.23$ мкм. Это почти предел, которого можно достигнуть при работе в зеленой области спектра. Дальнейшее увеличение разрешающей способности возможно лишь при переходе к более коротким длинам волн. Такая возможность иллюстрируется на рис. 117*, где показаны фотографии одного и того же объекта, полученные в различных участках спектра. Видно, что при меньшей длине волны удается обнаружить в объекте более мелкие структуры.

Применение указанного способа имеет практический интерес не только в тех случаях, когда необходимо получить предельную разрешающую способность. Так как иммерсионный объектив в обращении сложнее, нежели сухой, то, выбрав для работы последний, можно компенсировать снижение апертуры уменьшением длины волны света. Разумеется при этом не должно быть каких-либо ограничений для работы в коротковолновой области спектра, например, нет необходимости применять красный контрастирующий светофильтр.

Полезное увеличение микроскопа для средней области спектра лежит в пределах $(500 \div 1000)\,A$. В силу тех или иных причин фотографирование объекта часто производят в свете с большей (красный участок спектра) или с меньшей (синий участок спектра) длиной волны, но при этом не всегда учитывают имеющее место изменение полезного увеличения. Зависимость последнего от длины волны представлена на рис. 118 в виде заштрихованной зоны, ограниченной кривыми, соответствующими значениям εp 0.15 и 0.30 мм. Считается, что если увеличение выбрано в указанных пределах, то полностью реализуется разрешающая способность прибора. Здесь полезно сделать следующие два замечания.

1) В сравнительно редких случаях применяют апертуру, значительно завышенную по сравнению с той, которая необходима для достижения определенной разрешающей способности. Это бывает вызвано, например, причинами, связанными с энергетикой прибора. При этом не всегда

целесообразно стремиться к достижению полезного увеличения. Как правило, его следует выбирать меньше нижнего предела, равного 500 A.

2) Довольно часто встречаются препараты, в которых размеры структуры почти не отличаются от разрешающей способности микроскопа. Длительное рассматривание фотографий такого препарата, полученных при увеличении, равном полезному, утомительно для глаза, так как размеры отдельных элементов изображения близки к остроте зрения. В этих случаях желательно иметь больший масштаб изображения. Зачастую стремятся получить масштаб, в 2—3 раза превосходящий полезное увеличение. Достижение таких больших увеличений для визуального исследования затруднительно из-за нежелательных явлений, возникающих в глазу при малых выходных зрачках прибора. В микрофотографии дело обстоит проще, так как изображение на снимке рассматривается невооруженным глазом, имеющим достаточно большой зрачок. Получение же фотографии с масштабом изображения, превышающим полезное увеличение в 3 и даже 5 раз, вполне осуществимая задача. Преимущество работы при завышенном увеличении можно представить по фотографиям на рис. 119*, одна из которых имеет масштаб изображения 1000 A, а вторая — 3000 A.

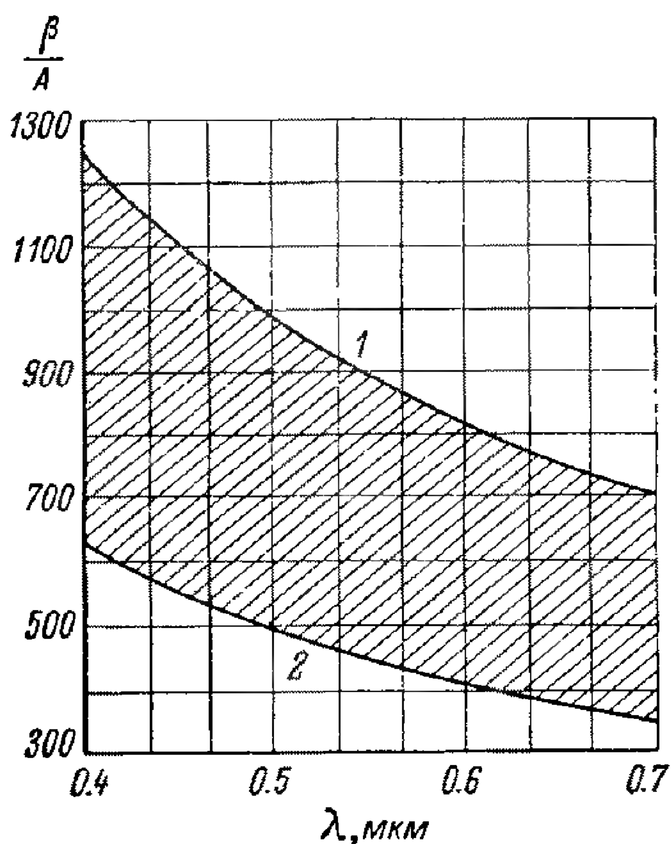


Рис. 118. Зависимость отношения полезного увеличения к апертуре от длины волны.

1 — для εp=0.30 мм; 2 — для εp= = 0.15 мм.

Масштаб изображения пропорционален увеличениям объектива и окуляра, а также длине камеры, как следует из приведенной формулы (стр. 137). Она справедлива для обычного микроскопа, состоящего из объектива и окуляра. В случае работы на приборе с объективами, рассчитанными на бесконечную длину тубуса, надо пользоваться формулой (58), а при работе с гомалями — формулой (68).

Оптическая система многих микроскопов (не считая объектив и окуляр) имеет собственное увеличение, величина которого не равна единице. Естественно, что эта величина должна быть введена множителем в формулы для подсчета масштаба изображения.

По формулам можно найти только приближенную величину масштаба изображения, так как фактические значения длины камеры, увеличений объектива и окуляра могут отличаться на несколько процентов от номинальных, которые указываются в паспортах и гравируются на самих изделиях. Точную величину масштаба изображения определяют с помощью объект-микрометра.

Объект-микрометр представляет собой прозрачную или непрозрачную стеклянную пластинку, на поверхности которой нанесена шкала. Прозрачной пластинкой пользуются при работе в проходящем свете, непрозрачной — в отраженном. Шкала имеет длину 1 или 2 мм, а расстояние между ее соседними штрихами равно 0.01 мм. Шкалу микрометра фотографируют через микроскоп при тех же условиях, что и исследуемый объект. Фотографическую печать с полученных негативов производят при одном увеличении. Измерения производят следующим образом.

К снимку объект-микрометра прикладывают линейку с миллиметровой шкалой так, чтобы какое-нибудь деление линейки совпало с одним из

штрихов на снимке. Затем находят другое деление линейки, точно против которого будет расположен штрих на снимке. Если между этими делениями линейки M интервалов, а между штрихами снимка N интервалов шкалы, то масштаб изображения равен $100\ M/N$. Например, 30 делениям миллиметровой линейки (на рис. 120) соответствует 10 делений изображения объект-микрометра; следовательно, масштаб изображения на этой фотографии равен 300. Для повышения точности при измерении целесообразно брать возможно большее число делений.

Если фотографирование производится на пластинку, печатание с которой предполагается выполнять контактным способом, то масштаб изображения можно определить путем измерения изображения объект-

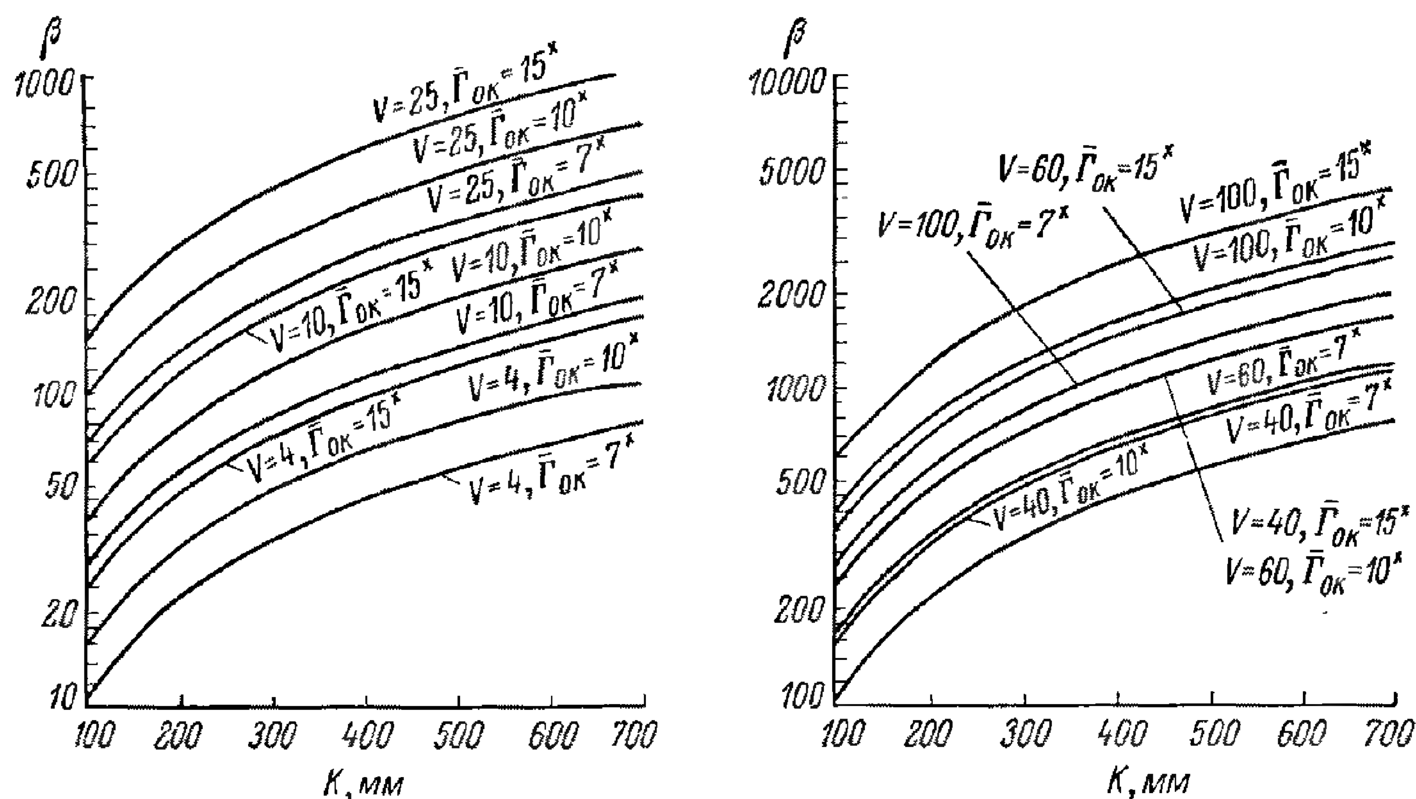


Рис. 121. Зависимость масштаба изображения от длины камеры при различных объективах и окулярах.

микрометра на матовом стекле фотокамеры. При небольших увеличениях, когда освещенность достаточно велика, это особого труда не составляет.

Иногда возникает необходимость в получении фотографий с заданным масштабом изображения. В этом случае следует, меняя увеличение прибора, установить изображения штрихов объект-микрометра на определенном расстоянии друг от друга, после чего при работе с фотопластинкой производить съемку объекта или печатание фотографий, если для съемки использовалась пленка. Например, требуется масштаб 500 : 1, тогда длина изображения десяти интервалов шкалы объект-микрометра в плоскости фотографии должна равняться 50 мм.

Один и тот же масштаб изображения можно получить путем нескольких сочетаний различных значений длины камеры и увеличений объектива и окуляра. Графически эти возможности представлены на рис. 121. Длину камеры можно изменять в значительных пределах и тем самым получать требуемый масштаб изображения, следя лишь за тем, чтобы ход лучей по крайней мере в объективе соответствовал расчетным условиям. Этот способ особенно удобен при бесступенчатом изменении длины камеры, так как обеспечивает любой масштаб в некотором диапазоне. Облегчить выбор масштаба в зависимости от длины камеры можно с помощью соответствующей шкалы, построенной предварительно по данным расчета или графиков рис. 121 и установленной вдоль камеры.

Несколько иначе обстоит дело с выбором увеличений объектива и окуляра. Практика показывает, что качества двух изображений, имеющих один и тот же масштаб, отличаются друг от друга, если одна фотография получена с сильным объективом и слабым окуляром, а вторая — со

слабым объективом и сильным окуляром. В последнем случае наблюдается некоторая нерезкость изображения деталей. В случае объекта с очень тонкой структурой изображение многочисленных деталей на его фотографии будет не очень четким, что, конечно, скажется отрицательно на общем впечатлении от снимка. Поэтому для работы целесообразно подбирать более сильный объектив и окуляр сравнительно небольшого увеличения.

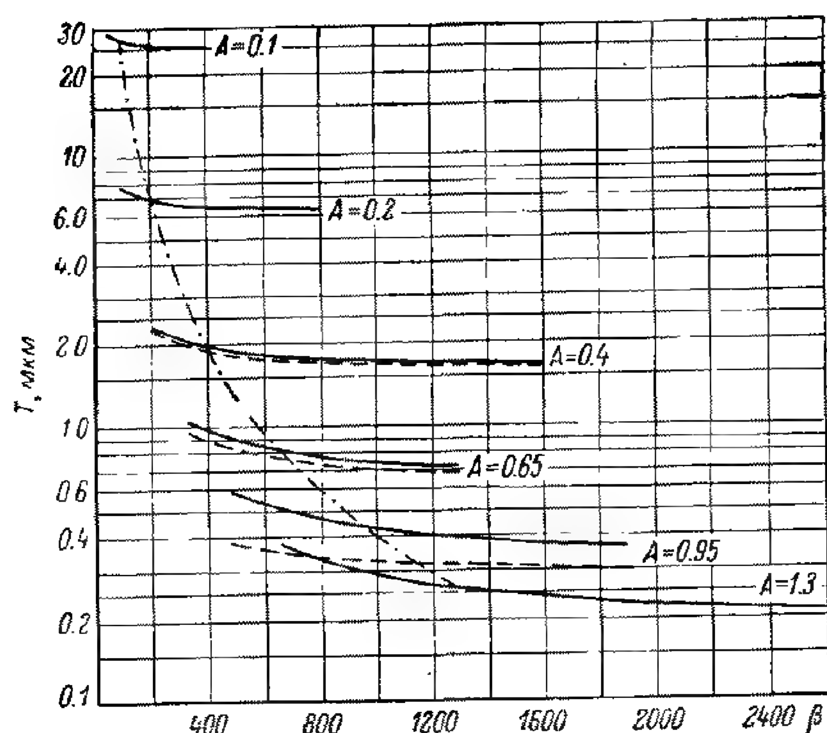


Рис. 122. Зависимость глубины резкости от масштаба изображения при различных апертурах.

Г л у б и н а р е з к о г о и з о б р а ж е н и я представляет сумму геометрической и волновой глубин, причем соотношение между последними двумя зависит как от апертуры, так и от масштаба изображения. Для зеленого света ($\lambda=$ $=0.5$ мкм) величины геометрической и волновой глубин равны друг другу тогда, когда масштаб изображения составляет около 500 апертур. При меньшем масштабе возрастает влияние геометрической глубины, при большем — волновой. На рис. 122 представлена зависимость общей глубины резкого изображения от масштаба при различных апертурах. Случаю $\beta=1000\ A$ соответствует штрих-пунктирная линия. Сплошные линии построены на основании вычислений по приведенной выше формуле.

Если учесть поправку на $\cos u_m$, о которой сообщалось в гл. II, то зависимость глубины от масштаба изображения должна быть представлена штриховыми линиями.

Можно сказать также несколько слов о влиянии длины волны света на глубину резкого изображения. Анализ графиков на рис. 123 приводит к выводу, что изменение длины волны тем больше влияет на глубину резкого изображения, чем выше увеличение при данной апертуре. Полезно иметь в виду, что глубина возрастает с увеличением длины волны.

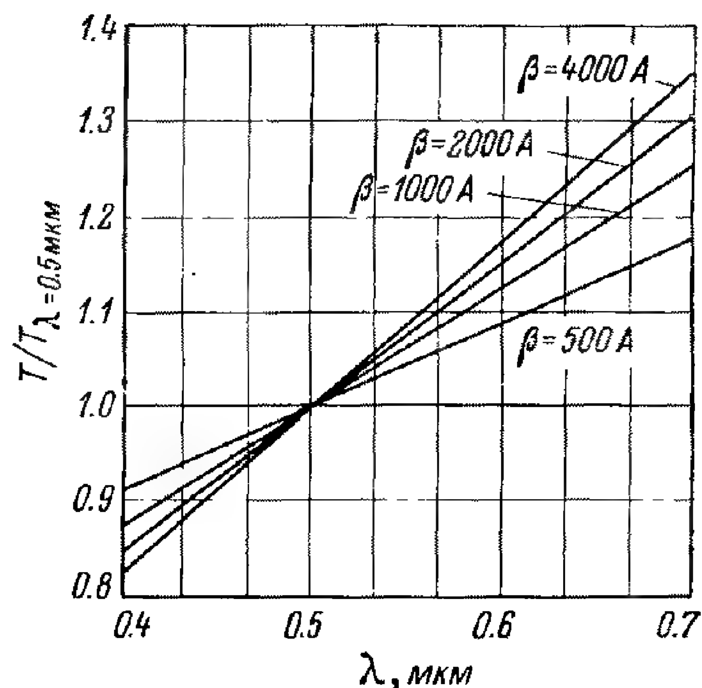


Рис. 123. Зависимость глубины резкого изображения от длины волны света при разных увеличениях.

В некоторых случаях, как сообщают, удается повысить глубину изображения путем последовательного фотографирования на один и тот же кадр нескольких соседних слоев препарата. Достигается это посредством незначительной перефокусировки микроскопа и последовательного освещения слоев препарата, находящихся в данный момент в фокусе и фотографируемых на один кадр пленки. Фирма Электроникс и Эллойс (США) выпускает для этих целей специальный микроскоп.

Большая глубина резкого изображения может способствовать получению хорошей фотографии, на которой изображение будет иметь как бы

достаточную объемность. Но иногда большая глубина приводит к плохому качеству фотографии. Большая глубина часто необходима при исследовании непрозрачных объектов с неровной поверхностью. Толстый препарат с крупными элементами, не имеющими мелкой структуры, требует значительной грубины изображения. В противном случае фотография получится неудачной из-за потери резкости при переходе к выступающим деталям. В противоположность этому для толстого препарата с очень мелкой структурой необходима маленькая глубина изображения. Иначе на фотографии друг на друга наложатся изображения нескольких элементов структуры, расположенных на разных расстояниях по глубине. Фотография от этого только проиграет.

Освещенность изображения при фотографировании в обычной микроскопии, как правило, не накладывает каких-либо ограничений на работу. Исключение составляет, например, фотографирование движущихся объектов. Приведенная выше формула определяет освещенность на пластинке в отсутствии объекта. Если на приборе установлен объект, то его коэффициент пропускания (или отражения) должен быть введен множителем в указанную формулу.

В отличие от других параметров освещенность в значительной степени зависит от величины осветительной апертуры. Если последнюю, например, уменьшать в отношениии $1:2:4$, то освещенность будет падать в отношении $1:4:16$, тогда как разрешающая способность изменяется в другой пропорции, а именно (при апертуре объектива $A=1.0$) $\frac{1+1}{2}:\frac{1+0.5}{2}:\frac{1+0.25}{2}$.

При заданных апертуре и масштабе изображения есть только одно средство повышения освещенности, когда это необходимо,—применение источника света с большей яркостью.

Как сообщалось в гл. II, освещенность в большой степени зависит от метода исследования, который применен для работы; в микроскопии она может иметь значение от сотни до сотых долей люкса и меньше. Преграду малым освещенностям обычно ставят только предельно допустимые время экспонирования и светочувствительность фотоматериала.

Поле зрения микроскопа зависит только от масштаба изображения при выбранном размере кадра, если последний не выходит за пределы углового поля зрения окуляра. В противном случае поле зрения будет ограничиваться диафрагмой окуляра. Это имеет место тогда, когда применена камера малой длины.

Закономерно стремление к получению возможно большого поля зрения, потому что тогда на фотографии размещается изображение большего участка объекта. Но в ряде случаев полезно искусственно уменьшить поле зрения, повысив масштаб изображения. Это рекомендуется при плохом покровном стекле, а также для устранения из поля зрения изображения каких-либо дефектов объекта или тех элементов препарата, которые не получаются резкими.

3. ВЫБОР АППАРАТУРЫ И НАСТРОЙКА ЕЕ ДЛЯ РАБОТЫ

Чем ответственнее выполняемая работа и чем выше требования· предъявляемые к микрофотографиям, тем строже должен быть подход к качеству аппаратуры, на которой производится съемка. Однако даже самые высококачественные приборы не обеспечат получение хорошей фотографии, если не будут обеспечены требуемые условия для их работы.

К осветительной системе прибора для микрофотографирования предъявляются два повышенных требования: 1) источник света, как правило, должен иметь высокую яркость и 2) юстировка си-

стемы должна быть безукоризненной. Последнее достигается путем особо тщательной настройки осветительной системы по способу Кёлера. Порядок работы следующий:

1) открыть полевую диафрагму осветителя и закрыть апертурную диафрагму конденсора;

2) направить световой пучок на центр зеркала микроскопа;

3) наклоняя зеркало, осветить апертурную диафрагму;

4) изменяя расстояние между лампой и коллектором, спроектировать нить лампы на апертурную диафрагму, как это показано на рис. 124*, *а*; увидеть диафрагму можно, взглянув на конденсор со стороны освещающего пучка; при этом надо обратить внимание на то, чтобы в отверстие диафрагмы проектировалось изображение возможно большего числа витков нити, если последняя имеет неравномерную или неплотную навивку;

5) раскрыть апертурную диафрагму и сфокусировать препарат;

6) закрыть полевую диафрагму; в поле зрения будет наблюдаться нерезкий светлый круг (рис. 124*, *б*);

7) спроектировать резкое изображение полевой диафрагмы в поле зрения посредством перемещения конденсора вдоль оси (рис. 124*, *в*);

8) качанием зеркала, перемещением конденсора в горизонтальной плоскости или другим способом, предусмотренным в конструкции прибора, отцентрировать изображение полевой диафрагмы относительно кадровой рамки или диафрагмы окуляра (рис. 124,* *г*);

9) раскрыть полевую диафрагму настолько, чтобы ее изображение было несколько больше кадровой рамки (рис. 124,**д*);

10) вынуть окуляр и, наблюдая визуально или с помощью вспомогательного микроскопа за выходным зрачком объектива, раскрыть апертурную диафрагму до $^2/_3$ диаметра зрачка; при этом изображение апертурной диафрагмы должно быть полностью заполнено изображением нити лампы (рис. 124,* *ж*); если в приборе есть специальная линза для наблюдения зрачка, то вынимать окуляр не требуется;

11) установить на место окуляр;

12) закрепить на микроскопе фотонасадку; перемещая окуляр визирной трубки вдоль оси, сфокусироваться на сетку, имеющую обычно кадровую рамку и биштрихи; подправить фокусировку микроскопа так, чтобы изображения сетки и объекта были видны одновременно резкими.

После этого можно приступать к фотографированию объекта. Полезно сделать несколько замечаний к методике настройки освещения.

1. Иногда бывает так, что поле зрения оказывается частично срезанным с одной стороны или имеет некруглую форму (рис. 124,* *е*). Чаще всего это объясняется перекосом какого-либо элемента прибора или экранирующим действием какой-либо оправы или детали. Не всегда легко удается обнаружить причину, но все-таки следует ее найти и устранить.

2. Приведенные выше фотографии получены на приборе с зеркалом, имеющим отражающее покрытие на наружной поверхности, обычно же с целью сохранности зеркальное покрытие наносится на внутренней поверхности. В этом случае в поле зрения микроскопа наблюдается три изображения полевой диафрагмы (рис. 125*), основное из них — наиболее яркое. На него и следует ориентироваться при настройке освещения.

3. Хотя из теории следует, что изображение апертурной диафрагмы в плоскости выходного зрачка объектива должно полностью покрывать зрачок, тем не менее на практике размер этого изображения уменьшают приблизительно на одну треть. Если же раскрыть диафрагму полностью, то контраст изображения резко падает (рис. 126*, *а*). Поэтому полную

осветительную апертуру используют только в редких случаях работы с объектами, размеры которых находятся на пределе разрешения. Если, наоборот, изображение диафрагмы будет много меньше зрачка объектива, то заметно уменьшается разрешающая способность (рис. 126*, *в*), становится заметной дифракция на мелких посторонних частицах, а вокруг контрастных элементов появляются светлые каемки. Такая картина считается неудовлетворительной.

4. Большинство конденсоров неахроматизованы и образованное ими изображение полевой диафрагмы имеет цветную кайму. Поэтому при небольших перемещениях конденсора по высоте меняется окраска поля зрения. На фотографиях рис. 136* видно, что если конденсор находится несколько выше нормального положения, то поле зрения имеет синеватый оттенок, если несколько ниже, то красноватый. На это обстоятельство особенно следует обращать внимание при цветной фотографии.

5. Работая со слабыми объективами, в поле зрения микроскопа, как правило, можно наблюдать нерезкое изображение нити лампы даже после тщательной настройки освещения по Кёлеру (рис. 127*). Избавиться от этого недостатка можно только с помощью матового стекла. Помещать его следует по возможности перед полевой диафрагмой, иначе ее не будет видно в поле зрения.

Так как настройка освещения часто недооценивается, то следует еще раз подчеркнуть, что способ Кёлера дает возможность получить в высокой степени равномерную освещенность по всему полю зрения, а количество рассеянного света свести до минимума. Если поле зрения будет освещено неравномерно, то на изображение объекта наложится структура неравномерного освещения, что приведет к плохому качеству фотографии, а иногда даже к ложному толкованию объекта. Рассеянный же свет снижает контраст и тем самым также приводит к ухудшению качества снимка.

Настройка освещения для работы по методу фазового контраста в основном подобна описанной выше, но имеет одну особенность. Апертурную диафрагму следует раскрыть полностью, а изображение кольцевой диафрагмы конденсора должно быть точно центрировано относительно фазового кольца в объективе, что осуществляется поперечным перемещением кольцевой диафрагмы в конденсоре. Наблюдение колец в выходном зрачке производится с помощью вспомогательного микроскопа. При правильном положении колец обеспечивается нормальный эффект (рис. 128*, *а*). Если кольца плохо центрированы, то контраст изображения падает и почти совсем пропадает, когда кольца не покрывают друг друга (рис. 128*, *б*).

Исследования по методу темного поля требуют определенного навыка, поэтому целесообразно освоить сначала обычное наблюдение в светлом поле и способ Кёлера. При настройке темнопольного освещения надо сначала несколько приподнять конденсор и по возможности сфокусировать микроскоп. В выходном зрачке объектива должно быть видно светлое кольцо (рис. 129*, *а*). Это кольцо следует ориентировать концентрично относительно зрачка (рис. 129*, *б*). Должного эффекта темного поля в этом случае не наблюдается (рис. 129*, *г*). Перемещая конденсор вдоль оси, необходимо найти такое положение, при котором изображение светлого кольца выйдет за пределы зрачка (рис. 129*, *в*). Тогда исследуемый объект будет виден на темном фоне. Надо заметить, что правильное освещение можно настроить, если толщина предметного стекла не превышает 1 мм.

При работе с иммерсионным объективом между ним и препаратом в обязательном порядке должна быть помещена та иммерсионная жид-

кость, на которую рассчитан объектив. Конденсоры предназначены для работы, как правило, с масляной иммерсией. Она вводится между препаратом и конденсором при работе по методу темного поля, в остальных случаях — сравнительно редко.

Оптическая система микроскопа должна удовлетворять самым высоким требованиям, поэтому следует придирчиво подходить в выбору объектива и окуляра.

Объектив микроскопа должен иметь минимально возможные аберрации и давать изображение высокого качества. Применение объектива в расчетных условиях — залог хороших результатов работы. Нельзя допускать изменения длины тубуса, толщины покровного стекла и вида иммерсии, на которые рассчитан объектив. Характеристики эти указываются на его оправе. Объективы с апертурами выше 0.5 очень чувствительны к отклонениям толщины покровного стекла от нормальной величины, равной 0.17 мм. Стекло нестандартной толщины вносит сферическую аберрацию, которая приводит к размытию изображения. Изображение одного и того же препарата будет четким при правильном подборе покровного стекла (рис. 130*, *а*) и совершенно неудовлетворительным при слишком тонком или толстом стекле (рис. 130*, *б*). Объективы масляной иммерсии малочувствительны к изменениям толщины покровного стекла.

Некоторые типы сухих высокоапертурных объективов снабжены специальной оправой, с помощью которой можно компенсировать аберрацию, вносимую покровным стеклом нестандартной толщины. На кольце коррекционной оправы нанесена шкала толщины покровного стекла. При работе с другими сильными объективами аберрацию отчасти можно компенсировать посредством небольшого изменения длины тубуса, если такая возможность предусмотрена в конструкции микроскопа. Для стекол тоньше стандартных тубус следует удлинить, для более толстых — укоротить. Проверку качества изображения производят одним из способов, о которых сообщалось в главах I и III.

Как известно, хроматическая коррекция ахроматического объектива недостаточно совершенна, что приводит к появлению цветных каемок вокруг контуров деталей объекта. Визуально такая окраска заметна, но глаз как бы отфильтровывает ее и впечатления нерезкости не создается. На фотографии каемки приводят к размытию изображения. Примером может служить иллюстрация на рис. 131*, *а*. Изображение того же объекта, снятое с тем же объективом, но в зеленом свете, получается достаточно резким (рис. 131*, *б*). Для обычных работ оно вполне удовлетворительно. Наиболее ответственную съемку целесообразно производить с апохроматическим объективом, дающим высококачественное изображение в белом свете.

Можно было бы не говорить о естественном желании получать фотографии с хорошей резкостью по всему полю, если бы ахроматические и апохроматические объективы не имели кривизны изображения. С этим недостатком в какой-то мере еще мирятся при визуальном наблюдении, так как можно последовательно увидеть центральную и краевые зоны поля зрения, прибегнув к незначительной перефокусировке микроскопа. При микрофотографировании это исключается, поэтому принимают специальные меры, чтобы избавиться от кривизны изображения или уменьшить ее.

На рис. 132*, *а* представлена микрофотография, полученная с ахроматическим объективом и обычным окуляром. Если допустить некоторое ухудшение качества изображения, то можно увеличить диаметр сравнительно резкого изображения, сфокусировав микроскоп на кольцевую зону, расположенную между центром и краем поля зрения (рис. 132*, *б*).

Это наиболее доступный способ, так как он не требует какого-либо специального оборудования.

Хороший результат дает применение гомалей вместо окуляра. Гомаль, сохраняя высокое качество изображения, обеспечивает удовлетворительную резкость по всему полю зрения (рис. 132*, *в*), но диаметр поля несколько уменьшается. Последнее обстоятельство не имеет значения при достаточно большой длине камеры, когда размер поля зрения определяется размером кадра. Гомалями комплектуются некоторые металлографические микроскопы и установки для микрофотографирования.

Наилучший результат достигается с планахроматическими и планапохроматическими объективами, которые дают резкое изображение в пределах большого поля зрения (рис. 132*, *г*). При этом окуляр не требуется заменять гомалью. Однако надо быть осторожным в применении окуляров с увеличенным линейным полем зрения; иногда можно столкнуться, например, с появлением дисторсии на краю поля (рис. 132*, *д*).

Окуляр следует выбирать в зависимости от того, с каким объективом предполагается работать: слабые и средние ахроматические объективы требуют применения окуляров Гюйгенса; сильные ахроматические и апохроматические объективы должны использоваться с компенсационными окулярами; планобъективы надо сочетать либо с компенсационными, либо со специальными окулярами.

Неправильный выбор окуляра приводит к ухудшению качества изображения краевых участков. На рис. 133* приведены микрофотографии, полученные с одним и тем же планобъективом, но с разными окулярами. Первая из них (рис. 133*, *а*) снята с окуляром Гюйгенса; на краях поля линии размыты из-за хроматизма увеличения. Экспонирование второй (рис. 133*, *б*) производилось с пурпурным светофильтром, устранившим зеленый свет, поэтому в изображении линий остались только наружные красные и внутренние синие каемки. При освещении через зеленый светофильтр все линии одинаково резкие (рис. 133*, *в*). Такого же результата можно достигнуть при работе в белом свете, но с компенсационным окуляром.

Замена окуляра для визуального наблюдения фотоокуляром приведет к тому, что вся оптическая система микрофотографического прибора будет работать в расчетных условиях. Естественно, что это наиболее удачный вариант, но фотоокуляры не всегда имеются в наличии. Если, работая с обычным окуляром, резкое изображение в плоскости кадра получено путем фокусирования всего микроскопа, то расчетный ход лучей будет нарушен и качество изображения понизится. Улучшить качество можно, сохранив хотя бы для объектива нормальные условия работы. Осуществить это можно, отодвинув окуляр от объектива. Такая операция выполняется либо посредством увеличения длины тубуса микроскопа, либо с помощью колец, помещаемых между опорной поверхностью окуляра и срезом тубуса. Первый способ выполним на приборах, в конструкции которых предусмотрена возможность изменения длины тубуса. Для второго способа необходимо изготовить соответствующие детали. Величина потребного удлинения расстояния между объективом и окуляром зависит от длины камеры и увеличения окуляра. На основании табл. 10 можно заключить, что удаление окуляра должно быть тем меньше, чем больше его увеличение и длина камеры. С этой точки зрения во многих случаях целесообразно применять более сильные окуляры, так как они требуют малого удлинения тубуса. На практике можно пренебречь величиной удлинения менее 3 мм.

Штатив микроскопа, применяемого для фотографирования, должен быть возможно более жестким, чтобы обеспечить стабильное положение частей прибора в процессе съемки. Исходя из этого следует отдавать

ТАБЛИЦА 10

Приближенные значения удлинения тубуса в зависимости от длины камеры и увеличения окуляра

Длина камеры, мм	Удлинение тубуса при окуляре, мм			
	5×	7×	10×	15×
125	28	10	5	2
250	11	5.5	2.5	—
400	6	3	1.5	—
500	5	2.5	—	—

ТАБЛИЦА 11

Собственное увеличение и размер кадра микрофотонасадок

Шифр фотонасадки	Увеличение	Размеры кадра, мм
МФН-7	0.5	65×90
МФН-8	1.0	90×120
МФН-9	0.7	60×60
МФН-11 *	2.6, 3.8, 6.0	24×36
МФН-12	0.5	24×36

* При работе с насадкой МФН-11 окуляр микроскопа отсутствует.

предпочтение приборам с неподвижным тубусодержателем, таким как МББ-1, МБИ-11, МИН-8. В тех микроскопах, где механизм грубой фокусировки снабжен тормозным устройством, рекомендуется пользоваться последним во время экспонирования. Кроме того, одновременным вращением обеих рукояток грубой фокусировки в противоположные стороны следует отрегулировать механизм так, чтобы исключалось его самопроизвольное движение.

Нужно следить чтобы подвижные элементы прибора были установлены в фиксированные положения, а стопорные винты съемных узлов были завернуты до отказа. Препарат должен быть хорошо фиксирован на поверхности предметного столика.

Все перечисленные меры способствуют сохранению стабильной фокусировки микроскопа.

Устройство для фотографирования выбирают с учетом следующего.

Поле зрения микроскопа с пластиночной камерой больше, чем с пленочной. Изображение объекта на матовом стекле пластиночной камеры представляется наблюдателю таким, каким оно будет на фотографии. Визирный тубус микрофотонасадки не дает такой наглядности. Однако наблюдение на матовом стекле при больших увеличениях осложнено малой освещенностью.

Фотографирование на пластинки предпочтительней тогда, когда, во-первых, производится разовая съемка одиночных объектов, а, во-вторых, не предполагается дальнейшее увеличение при изготовлении позитивов. Пленка же больше подходит для массовых съемок и дает возможность осуществить в определенных пределах любое последующее увеличение.

При работе с пленкой требуемый масштаб изображения получают путем двухступенного увеличения: сначала при фотографировании на микроскопе, а затем при печатании позитива. Это имеет преимущество перед съемкой на пластинку, когда последующее увеличение негатива, как правило, не производится. Так как при печатании с пленки допустимо пяти-, десятикратное увеличение, то масштаб изображения во время съемки на микроскопе может быть уменьшен во столько же раз. Это влечет повышение освещенности изображения и уменьшение выдержки.

Ассортимент пластинок значительно меньше, чем пленок, что естественно, ограничивает применение пластиночных камер. Пленки легче хранить нежели пластинки.

Длина камеры микрофотонасадки постоянна, поэтому нельзя плавно изменять масштаб изображения. Установки для микрофотографирования,

напротив, имеют камеры переменной длины. Собственное увеличение фотонасадки (т. е. множитель $\frac{K}{p}$ в формуле для определения масштаба изображения) приведено в табл. 11.

Так как фотонасадка устанавливается чаще всего непосредственно на тубусодержателе, нагрузка на него увеличивается и ухудшаются условия работы. Может нарушиться, например, стабильность фокусировки или сказаться вибрация затвора, смонтированного в насадке. Поэтому особо ответственные съемки целесообразно производить на установках для фотографирования или на больших микроскопах с массивным штативом.

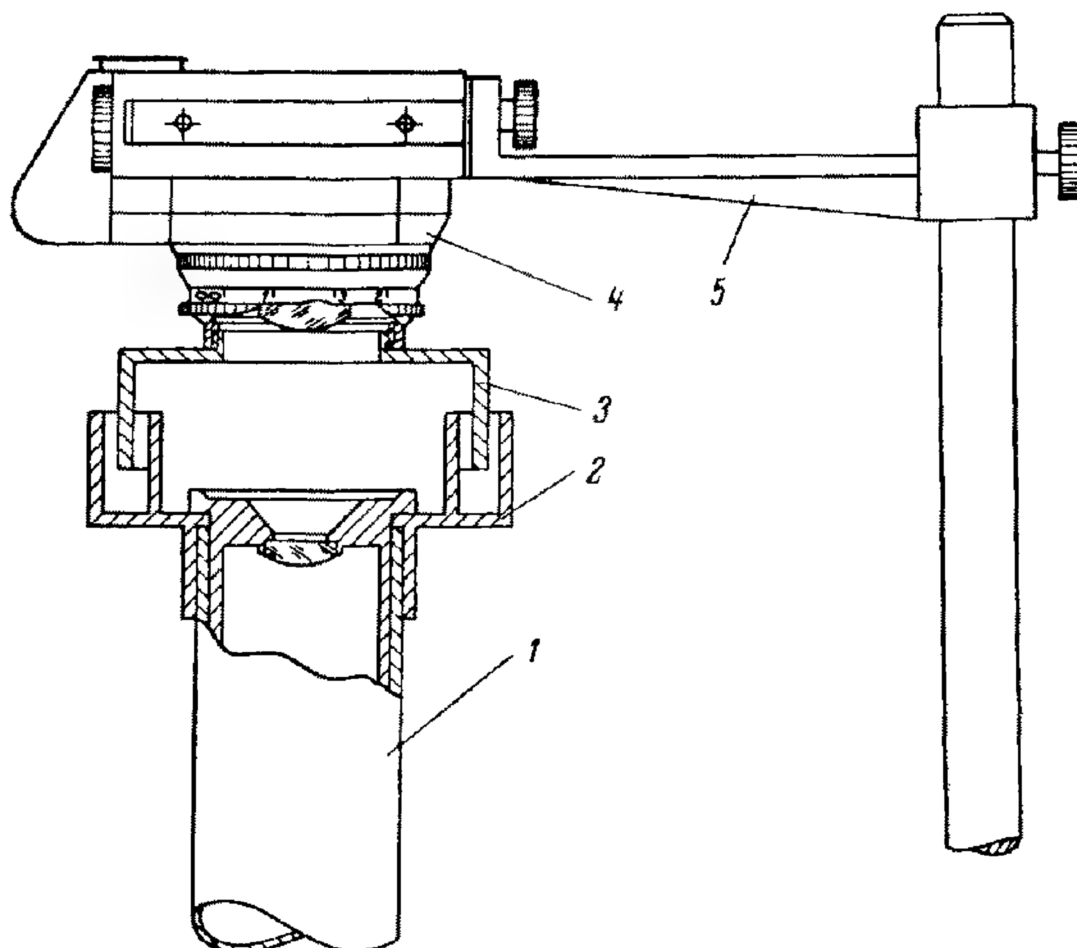


Рис. 134. Схема комбинирования микроскопа с любительской фотокамерой.

Фокусировка на резкое изображение при настройке прибора выполняется в зависимости от его конструкции одним из двух способов: по матовому стеклу пластиночной камеры или с помощью визирной трубки.

В первом случае для облегчения работы и более точной наводки на резкость рекомендуется пользоваться лупой на ножках. Лупу ставят на матовое стекло и фокусируют так, чтобы четко видеть матовую поверхность. Затем производят фокусировку микроскопа. При малых освещенностях изображения полезно иметь матовое стекло с прозрачными полосами. Тогда с помощью лупы можно одновременно видеть матовую поверхность и достаточно яркое изображение объекта на прозрачной полосе.

В случае насадки с визирной трубкой окуляр должен быть сфокусирован на биштрихи сетки. При фокусировке микроскопа надо следить за тем, чтобы изображения объекта и сетки были видны одновременно резкими. Прямоугольная рамка сетки ограничивает тот участок изображения, который вписывается на пластинку или кадр пленки.

Съемку через микроскоп можно производить и без фотонасадки с помощью любительской зеркальной фотокамеры. Монтаж установки осуществляется сравнительно просто (рис. 134). Фотокамеру (*4*) устанавливают над микроскопом (*1*) на специально изготовленном кронштейне (*5*). Детали *2* и *3* (одна закрепляется на объективе камеры, вторая — на тубусе микроскопа) исключают попадание в прибор постороннего света. Объек-

тив камеры устанавливается на бесконечность. Фокусировка микроскопа производится по матовому стеклу камеры.

Достоинство такой установки заключается в том, что можно производить съемку с малыми увеличениями. Если фокусное расстояние объектива камеры равно 50 мм, то его увеличение совместно с 5-кратным окуляром составляет $1^{\times}$, а с 15-кратным окуляром — $3^{\times}$.

4. ВЫБОР СВЕТОФИЛЬТРОВ

Светофильтры применяются в микрофотографии для ослабления света и изменения его спектрального состава.

Спектральная чувствительность глаза человека отличается от таковой фотографических материалов. Фиолетовые лучи, которые глаз почти не чувствует, оказывают сильное воздействие на фотографический материал, в то время как желто-зеленое излучение, соответствующее максимуму чувствительности глаза, не оказывает никакого влияния на несенсибилизированный материал. Таким образом, при применении для

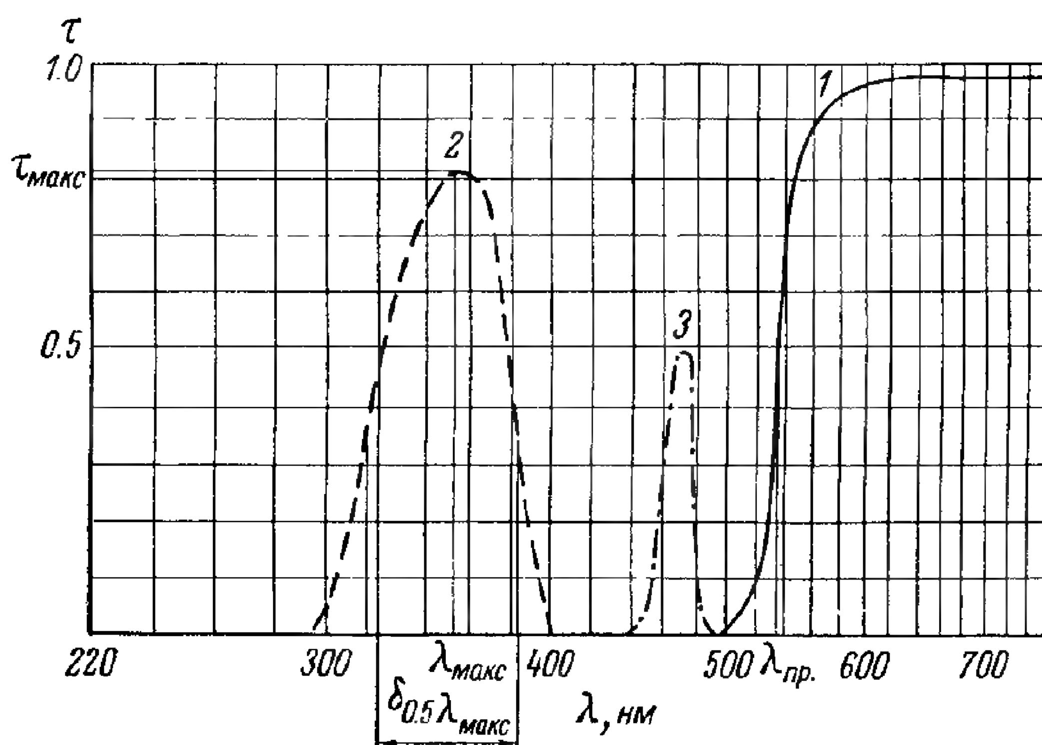


Рис. 135. Спектральные характеристики различных типов светофильтров.

1 — срезающий ОС12; 2 — зональный ЗС6; 3 — интерференционный.

микрофотографирования панхроматических, изопанхроматических и в особенности ортохроматических и несенсибилизированных материалов фотографическое изображение не будет соответствовать тому, что видит глаз при наблюдении объекта через микроскоп.

Для согласования спектральных чувствительностей фотографического материала и глаза применяются соответствующие светофильтры, изменяющие спектральный состав падающего на фотоматериал излучения. Светофильтры применяются в микрофотографии также для увеличения контраста изображения, изменения его освещенности и т. д.

Светофильтры, предназначенные для выделения излучений отдельных спектральных участков, разделяются на односторонние (срезающие) и двухсторонние (рис. 135). Первые применяются для срезания излучений с длиной волны, меньшей или большей заданной. К таким светофильтрам относятся, например, светофильтры БС, ОС, ЖС из каталога цветного стекла. Вторые, называемые зональными, применяются для выделения определенных (иногда довольно узких) спектральных участков. К ним относятся, например, стекла ФС, УФС, ЗС.

Односторонние светофильтры характеризуются $\lambda_{пр}$, соответствующей границе пропускания светофильтра. За границу пропускания условно принята длина волны, для которой коэффициент пропускания в два раза меньше максимального его значения или, что то же самое, для которой оптическая плотность на 0.3 больше, чем наименьшее ее значение.

К характеристикам зональных светофильтров, кроме оптической плотности и коэффициента общего (интегрального) пропускания относятся коэффициент пропускания в максимуме пропускания $\tau_{макс}$, длина волны $\lambda_{макс}$, соответствующая $\tau_{макс}$, и полуширина $\delta_{0.5\ \lambda_{макс}}$ — спектральный интервал, границы которого соответствуют $\tau_{\lambda}=0.5\,\tau_{макс}$. Соотношения коэффициентов пропускания и оптической плотности светофильтров приведены в приложении I.

В основе действия светофильтра может лежать любое оптическое явление, обладающее спектральной избирательностью: поглощение, отражение или интерференция света. Наибольшее распространение в микрофотографии получили абсорбционные и интерференционные светофильтры.

Действие абсорбционных светофильтров основано на избирательном поглощении света. Абсорбционные зональные светофильтры как бы состоят из двух односторонних светофильтров, каждый из которых срезает или коротковолновые или длинноволновые излучения.

Абсорбционные светофильтры бывают твердые, жидкие и газообразные. Твердые светофильтры изготавливаются из цветного стекла (например, наборы фильтров отечественного производства или фирмы Шотт, Иена), из окрашенного желатина (фильтры «Врэтэн» фирмы Кодак), из пластических масс. Отечественный набор цветного стекла состоит из 118 светофильтров размером 40×40 или 80×80 мм^2. Желатиновые светофильтры состоят из окрашенной желатиновой пленки, заключенной между двумя плоско-параллельными пластинками из бесцветного стекла. Серьезным недостатком этих светофильтров является их неустойчивость по отношению к некоторым внешним воздействиям. Нагрев или попадание влаги могут привести к расклейке, а органические растворители разрушают желатиновую пленку. Тем не менее они находят применение благодаря тому, что, во-первых, имеют хорошо воспроизводимые спектральные характеристики, а во-вторых, позволяют путем подбора различных красителей получить спектральную характеристику, практически совпадающую с требуемой.

Жидкостные светофильтры представляют собой кюветы, наполняемые раствором соответствующих веществ с избирательным поглощением. Обычно это цилиндрическая кювета из фарфора или металла, торцы которой закрыты стеклянными или кварцевыми пластинками. Преимущество таких светофильтров заключается в возможности получения самим экспериментатором требуемых абсорбционных свойств путем изменения вида или концентрации раствора. Однако жидкостные светофильтры неудобны в работе, поэтому в настоящее время в микроскопии они применяются лишь в качестве теплозащитных светофильтров. Для этой цели кювету заполняют водой или 4%-м медным купоросом, задерживающими тепловое излучение источника. Торцевые стеклянные пластинки водных светофильтров обычно изготовляются из теплозащитного стекла (например, СЗС14), что повышает эффективность светофильтра.

Абсорбционные зональные светофильтры выделяют обычно довольно широкие участки спектра. Для выделения узких спектральных интервалов применяются интерференционные светофильтры. Действие интерференционных светофильтров основано на интерференции света в пластинках или тонких пленках. Интерференционные светофильтры чаще всего представляют собой стеклянную подложку, на которую нанесены тонкие пленки определенных материалов заданной толщины. Область пропускания такого

светофильтра (кривая *3* на рис. 135) значительно меньше, а $\tau_{макс}$ больше, чем у светофильтров с полупрозрачными серебряными слоями. Коэффициент пропускания светофильтров с диэлектрическими слоями, изготовляемых для широкого диапазона спектра, доходит до 70—80% при полуширине пропускания около 5 нм. Необходимо отметить, что все характеристики интерференционных светофильтров приводятся для лучей, падающих по нормали к поверхности светофильтра. При наклоне светофильтра максимум пропускания перемещается в коротковолновую область спектра, например максимум пропускания светофильтра, находящийся при нормальном падении лучей в области 500 нм, смещается при повороте фильтра на 45° примерно на 20—30 нм. По этой причине в микрофотоустановке интерференционные светофильтры нельзя помещать в сильно сходящихся пучках, так как при этом ухудшится спектральная чистота падающего на объект или фотографический материал излучения. Регулировка наклона светофильтра иногда применяется для изменения области его пропускания.

Интерференционные светофильтры используются и в качестве срезающих фильтров, в этом случае они называются интерференционными светоделителями, которые получили особенно широкое распространение во флуоресцентной микроскопии.

К многослойным интерференционным светофильтрам относятся также клиновые интерференционные светофильтры с переменной длиной волны. Интерференционные слои таких фильтров наносятся в виде клина переменной толщины. Светофильтр работает как монохроматор, применение его позволяет плавно изменять длину волны света, зависящую от того, какой участок клина помещается в ход лучей. Например, клиновой интерференционный светофильтр фирмы К. Цейсс, Иена на длине 70 мм обеспечивает выделение узких спектральных участков (5 нм/мм) в видимой области спектра.

В зависимости от назначения светофильтры, применяемые в микрофотографии, подразделяются на следующие группы:

Компенсационные светофильтры употребляются для согласования спектральных чувствительностей фотографического материала и глаза (рис. 141). При наличии такого согласования черно-белый фотографический материал передает различные по плотности детали объекта в соответствии с градациями плотности, воспринимаемыми глазом.

Различие в восприятии объекта глазом и фотографическим материалом продемонстрировано на микрофотографиях рис. 164*. Первая микрофотография (рис. 164*, *а*) получена при съемке на панхроматическом материале с желто-зеленым светофильтром ЗС10, что соответствует восприятию этого объекта глазом. Вторая (рис. 164*, *б*) получена без светофильтра. Детали объекта, окрашенные в синий цвет, переданы на этой фотографии меньшими плотностями, чем на первой, и, следовательно, менее яркими они воспринимаются и глазом.

Компенсационные светофильтры в цветной микрофотографии применяются для приведения спектрального состава излучения источника в соответствие с требуемым для данной пленки. Такое согласование для цветного фотографирования особенно важно, так как правильная передача цвета фотографическими материалами возможна лишь при освещении объекта излучением того спектрального состава, на который рассчитан фотоматериал. Пленки для искусственного света предназначены для работы с источниками, имеющими цветовую температуру 3200—3400° К, тогда как пленки дневного света используются для источников с цветовой температурой 5500—6500°К. Рекомендации по выбору компенсационных светофильтров для цветного фотографирования даны на стр. 166.

Компенсационные светофильтры применяются также для согласования спектральных характеристик фотоэкспонометра и фотоматериала (о чем см. на стр. 172).

Надо обратить внимание на следующее обстоятельство. В зависимости от соотношения яркостей двух участков объекта, имеющих разный цвет, и спектральной чувствительности черно-белого фотоматериала изображения этих участков на снимке могут иметь одинаковые почернения. Различить эти детали можно либо на цветной фотографии, либо с помощью контрастирующих светофильтров.

Контрастирующие светофильтры применяются для изменения контраста наблюдаемых или фотографируемых изображений. При подборе таких светофильтров необходимо учитывать, что объекты, имеющие одинаковую с фильтром окраску, будут передаваться в светлых, а объекты, окрашенные в цвет, дополнительный к цвету светофильтра, в темных тонах. Таким образом, для повышения контраста деталей какого-либо цвета нужно выбирать светофильтр с окраской, дополнительной к цвету этой детали. Для иллюстрации выбора правильного контрастирующего светофильтра при фотографировании приведена серия микрофотографий (рис. 136*).

При микрофотографировании часто стремятся получить высокий контраст изображений, что, кроме подчеркивания различий в окраске структур объекта, создает также субъективное восприятие более резкого изображения. Однако в большинстве случаев следует избегать слишком сильного уконтращивания фотографируемых изображений, так как это неизбежно приводит к потере некоторых деталей объекта. Например, на рис. 137* приведены микрофотографии макрофага сальника белой мыши. При применении для фотографирования дополнительного по цвету окраски светофильтра ЗС1 контраст изображения очень высокий, но некоторые детали объекта (например, ядра лейкоцитов) на снимке пропадают; при применении светофильтра ОС11 видна структура всех деталей объекта при достаточном контрасте изображения.

Приведенный пример показывает, что при микрофотографировании в большинстве случаев целесообразно получать мягкие негативы с хорошей проработкой всех деталей снимаемого объекта.

Уконтрастить изображение, если это необходимо, всегда возможно при фотографической печати с этих негативов на контрастной бумаге. Получение при съемке очень контрастных негативов может быть оправдано в некоторых случаях: когда необходимо отделить от фона те или иные важные структуры объекта, незначительно отличающиеся по плотности от фона, для того, чтобы избежать появления на негативах изображений некоторых артефактов.

Следует иметь также в виду, что чем выше контраст фотографического материала, тем менее контрастирующее действие должен оказывать светофильтр. При фотографировании двухцветного объекта во многих случаях следует выбирать цвет светофильтра промежуточным между цветами объекта.

Применение светофильтра, совпадающего по цвету с цветом объекта, оправдано в случаях фотографирования сильно окрашенных объектов, что позволяет во многих случаях выявлять внутреннюю структуру этих объектов.

Часто на одном снимке не удается одновременно получить достаточно контрастное изображение двух структур, окрашенных в разные цвета или даже в один и тот же цвет, но с большой разницей в степени окраски или толщине объекта. Тогда рекомендуется произвести двукратное фотографирование объекта с применением двух светофильтров, каждый из которых выявляет одну из этих структур. Так, на микрофотографиях воло-

кон (рис. 138*), окрашенных в фиолетово-красный цвет разной густоты (что обусловлено разной толщиной препарата) при использовании зеленого светофильтра, центральные волокна получаются слишком темными, зато хорошо выявляется строение краевых волокон. С красным светофильтром лучше видны детали центральных волокон, а изображение краевых почти совсем не прорабатывается.

Еще один пример. На рис. 139* приведены три микрофотографии среза почки кролика, окрашенного по Маллори. На снимке, снятом без светофильтра, красные и голубые структуры почти не отличаются друг от друга. На снимке со светофильтром ЗС1 хорошо выявляются красные структуры, но голубые волокна сливаются с фоном. На снимке со светофильтром КС10 прорабатываются волокна, но исчезают красные структуры. Таким образом, применение в приведенном случае одного светофильтра не позволяет получить одновременно все детали объекта. Однако на практике в подобных случаях обычно делают только одну микрофотографию, для которой подбирают светофильтр, удовлетворительно выявляющий наиболее важные структуры. Подбором выдержки и условий проявления негатива часто можно получить на отпечатке даже те детали, изображения которых слабо уконтрашиваются светофильтром.

Некоторые конкретные рекомендации по выбору контрастирующих светофильтров даны в последующих главах.

Корригирующие светофильтры используются для повышения качества изображения. Они выделяют ту область спектра, для которой проведена коррекция объектива микроскопа. К этим светофильтрам относятся фильтры ЗС1, ЗС2, ЗС11. Применение их совместно с ахроматическими объективами позволяет получить достаточно хорошую резкость изображения.

Селективные, или избирательные, светофильтры предназначаются для выделения сравнительно узких участков ультрафиолетовой, видимой либо инфракрасной областей спектра. Эта область может соответствовать области поглощения либо флуоресценции объекта. К этой группе относятся, например, светофильтры, предназначенные для фотографирования в ультрафиолетовых лучах, свете флуоресценции, для съемок в высокотемпературной металлографии, в фазовоконтрастной микроскопии и др. Для выделения узкой области спектра (так называемого монохроматического света) целесообразно применять интерференционные светофильтры.

К этой же группе светофильтров относятся также синие светофильтры, применяемые для выделения коротковолновой части видимой области спектра.

Светофильтр СС1, который применяется для выделения синего излучения, характерен также следующим. Если обратиться к рис. 44, то очевидно, что коротковолновый участок спектра в излучении ламп накаливания менее, а длинноволновый более интенсивен, чем в излучении солнца или неба. Северная часть голубого неба считается наиболее удачным источником света по спектральному составу излучения. Применение светофильтра СС1 совместно с лампой накаливания дает возможность получить излучение, более или менее подобное излучению безоблачного неба. Такой светофильтр называют светофильтром дневного света.

Светофильтры для регулирования освещенности и защитные. Если микроскоп настроен правильно, то повысить освещенность изображения не представляется возможным. Однако часто возникает необходимость уменьшить освещенность. Осуществлять это путем уменьшения накала лампы нельзя, так как изменение накала, т. е. температуры светящегося тела, приводит к изменению спектральной кривой излучения. Нельзя также понизить освещенность, уменьшая диаметр апертурной диафрагмы конденсора, так как это приводит к снижению разрешающей способности

микроскопа. Кроме того, при значительном диафрагмировании в изображении структуры объекта могут появиться дифракционные каймы, приводящие к ложному представлению о структуре.

Для уменьшения освещенности изображения применяют матовые пластинки или нейтральные светофильтры. Первые не дают большого

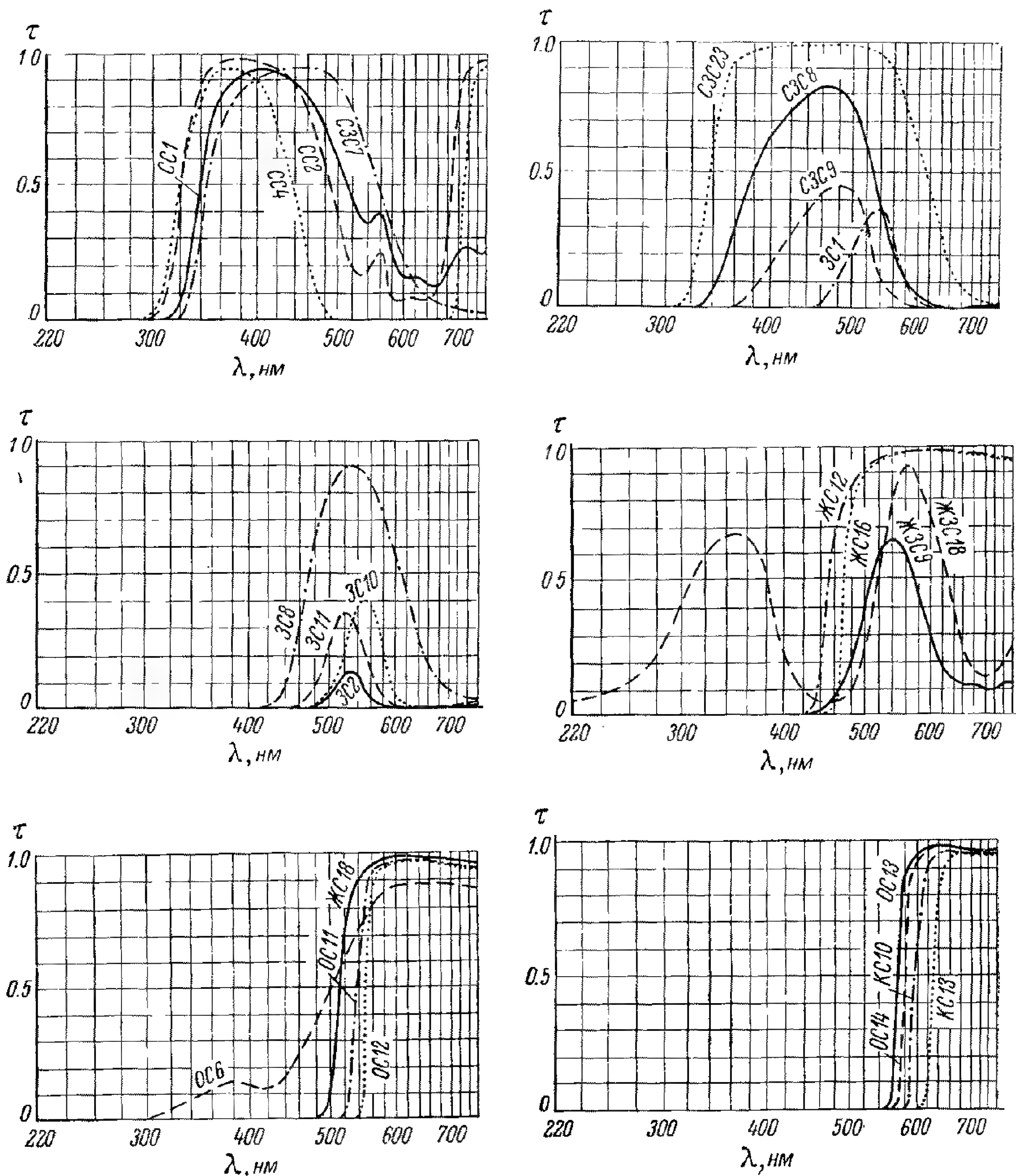


Рис. 140. Спектральные характеристики светофильтров для микрофотографии.

эффекта, со вторыми же можно получить довольно значительное ослабление света. Примером может служить светофильтр НС8. Такой светофильтр практически не селективен в большом спектральном диапазоне видимой области и поэтому ослабляет излучение, не меняя его спектрального распределения.

В качестве нейтральных светофильтров можно использовать также два поляроида. Коэффициент их пропускания, в зависимости от взаимной ориентации поляроидов, может плавно изменяться от 0 до 30%.

Плавное изменение освещенности можно осуществить также с помощью двух клиньев, выполненных из нейтрального стекла и сложенных так,

ТАБЛИЦА 12

Назначение светофильтров, применяемых в микрофотографии

Обозначения светофильтров		Цвет	Выделяемая область спектра	Назначение
отечественных	фирмы Шотт			
СС1			330—550	Светофильтр дневного света и для повышения разрешающей способности
СС2			320—520	Для повышения разрешающей способности
СС4			320—480	Светофильтр дневного света
СС9			320—700	
СС15	BG12		350—480	
СЗС7			340—600	Для повышения разрешающей способности. Контрастирующие для оранжевых и красных объектов
СЗС8			370—560	
СЗС9	BG7		400—540	
СЗС17			340—700	Светофильтр дневного света в сочетании с ПС5 и ПС14
СЗС20			360—540	Контрастирующий для красных объектов
СЗС23			330—650	Теплозащитные
СЗС26			300—700	
ЗС1	VG8		480—570	Корригирующие и контрастирующие для синих и красных объектов
ЗС2			500—560	
ЗС11	VG9		480—570	
ЗС8	VG11		450—670	Компенсационные, корригирующие и контрастирующие для синих и красных объектов
ЗС10	VG4		500—600	
ЗС6			370—420 и 480—540	Контрастирующие для синих и красных объектов
ЗС7	VG3		500—540 и 550—600	
ЖЗС9			470—650	Компенсационные, корригирующие и контрастирующие для синих и красных объектов
ЖЗС1			500—600	
ЖЗС18	VG5		500—670	Контрастирующие для синих объектов
ЖС12	GG9		460—700	
ЖС16			480—700	
ЖС18			520—700	
ОС5			540—700	
ОС6			460—700	
ОС11	OG1		540—700	
ОС12	OG2		550—700	
ОС13			570—700	
ОС14			580—700	
КС10	RG2		610—700	Контрастирующие для синих и зеленых объектов
КС13			640—700	
КС17	RG5		680—700	
НС6			360—700	Нейтральные для ослабления света
НС7			360—700	
НС8			360—700	Для ослабления света в цветной микрофотографии
НС9			360—700	
НС10			360—700	Нейтральные для ослабления света
НС11			360—700	
НС1			360—700	
НС2			360—700	
НС3			360—700	

Примечание. Светофильтры, применяемые в ультрафиолетовой, флуоресцентной и инфракрасной микроскопии, будут приведены ниже.

что они образуют плоско-параллельную пластинку. При перемещении одного клина относительно другого меняется толщина такой пластинки, а следовательно, и коэффициент ее пропускания. Такой фильтр переменной плотности может быть сделан не только из нейтрального, но и из цветного стекла.

Защитные светофильтры применяются для задержки вредного излучения. Светофильтры СЗС24 имеют слабую голубоватую окраску и не пропускают тепловое инфракрасное излучение. Они применяются как теплозащитные фильтры.

Светофильтр из бесцветного стекла БС8 не пропускает ультрафиолетовое излучение, поэтому его используют для защиты глаза, а иногда и препарата от вредного облучения ультрафиолетовым светом.

Нужно отметить, что в зависимости от задачи исследования один и тот же светофильтр может выполнять совершенно различные функции. Так, например, синий светофильтр СС4 может быть селективным (например, во флуоресцентной микроскопии), корригирующим (для повышения разрешающей способности микроскопа), контрастирующим для желтой и оранжевой окрасок объекта.

В табл. 12 указаны назначения применяемых в микрофотографии светофильтров, а на рис. 140 приведены кривые пропускания наиболее распространенных из этих светофильтров (толщина светофильтров 3 мм). В таблице указаны также марки некоторых фильтров фирмы Шотт, аналогичных отечественным.

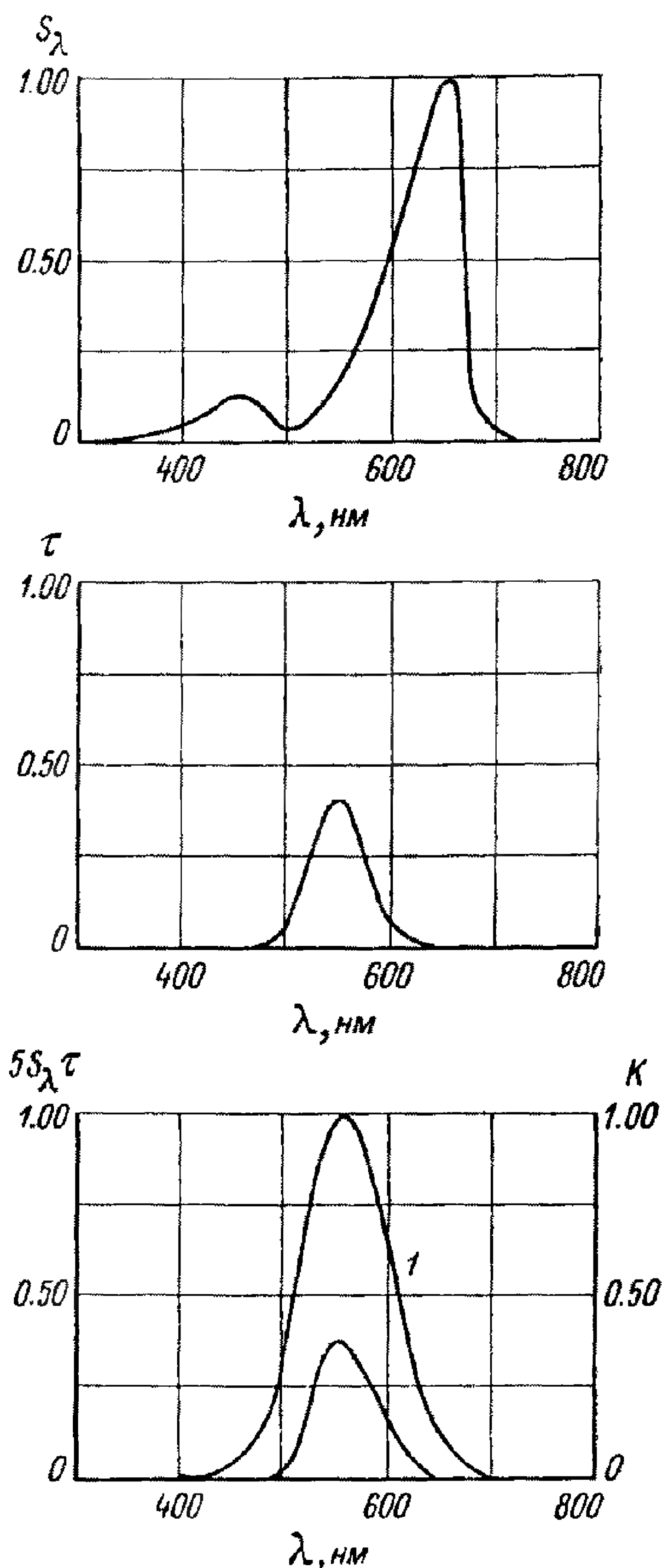


Рис. 141. Спектральные характеристики в относительных единицах панхроматического материала S_λ (для источника с цветовой температурой 2850° К), коэффициента пропускания τ светофильтра ЗС10 и результат их взаимодействия $S_\lambda\tau$. Кривая 1 представляет относительную спектральную чувствительность (относительную видность) глаза K.

Поглощение света светофильтром влияет не только на спектральный состав излучения, но также и на освещенность изображения. При использовании светофильтра величина экспозиции всегда возрастает. Степень изменения экспозиции характеризуется кратностью светофильтра, т. е. числом, показывающим, во сколько раз уменьшается световой поток при его прохождении через светофильтр. Кратность светофильтра зависит от его спектральных характеристик, источника излучения и негативного материала, на котором производится фотографирование. Эффект применения выбранного светофильтра совместно с определенным источником излучения и фотоматериалом наглядно представлен на рис. 141. Графически каждую точку результирующей кривой можно получить перемножением ординат кривых спектральной чувствительности фотоматериала

для данного источника света и пропускания светофильтра, соответствующих одной длине волны. Кратность каждого светофильтра выражается отношением площадей, занятых кривыми чувствительности каждого материала без применения светофильтра и при экспонировании со светофильтром. Определенные таким образом кратности наиболее распространенных в микрофотографии светофильтров при использовании для фотографирования различных материалов приведены в табл. 13.

ТАБЛИЦА 13

Ориентировочные значения кратности светофильтров, применяемых в микрофотографии, для различных фотоматериалов

Обозначения светофильтров (толщина 3 мм)	Ортохроматический материал		Панхроматический материал		Изопанхроматический материал	
	$T_ц = 2850$ °K	$T_ц = 6500$ °K	$T_ц = 2850$ °K	$T_ц = 6500$ °K	$T_ц = 2850$ °K	$T_ц = 6500$ °K
СС1	1.5	1.5	3.5	2.5	3.5	2.5
СС2	2	1.5	5.5	3	4.5	3
СС4	4	3	32	6	14	7.5
СЗС7	1.5	1.5	3.5	2	2.5	2.0
СЗС8	1.5	1.5	7.5	3	5	3
СЗС9	3.5	4	12	8.5	12	8
СЗС22	1	1	2	1.5	1.5	1.5
ЗС1	7.5	21	19	17	11	10
ЗС2	18.5	40	51	36	4.5	43
ЗС11	9.5	14	27	17.5	16	12
ЗС8	2	3	2.5	2.5	2	2.5
ЗС10	11.5	21	16	17.5	9	11.5
ЖЗС9	4	6	4	5	4	4
ЖЗС18	3.5	5.5	2	2.5	2	2
ЖС12	1.5	2	1	1.5	1.5	1.5
ЖС16	2	4	1	2	1.5	1.5
ЖС18	4	9.5	1	1.5	1.5	2
ОС6	3	3.5	1.5	1.5	1.5	2
ОС11	5.5	18	1.5	1.5	1.5	2.5
ОС12	11	37	1.5	1.5	2	2.5
ОС13	73	220	1	2	2	3.5
ОС14	220	—	1.32	2	2.5	4
КС10	—	—	1.54	2.5	4	5
КС13	—	—	2.25	4	11.5	12
Интерференционный ($\lambda_{макс}$=546 нм)	22	44	51	37	28	32.5

Спектрограммы можно получить и экспериментально. Для этой цели используется установка, состоящая из осветителя с источником света и спектрографа, в плоскости входной щели которого по ее высоте располагается фотометрический клин переменной плотности. Помещая между осветителем и спектрографом различные светофильтры и производя фотографирование на фотоматериалах разной сенсибилизации, можно получить спектрограммы, часть которых приведена на рис. 142. Спектрограммы соответствуют нескольким комбинациям различных источников света, фотоматериалов и светофильтров.

Из спектрограмм рис. 142 и табл. 13 видно, что светофильтр СС4 мало влияет на светочувствительность ортохроматического материала, но сильно уменьшает чувствительность изопанхроматического или панхроматического. Зеленый светофильтр ЗС10 оказывает примерно одинаковое влияние

на чувствительность всех сенсибилизированных материалов и может применяться как компенсационный светофильтр, так как спектрограмма с этим светофильтром очень близка к кривой видности человеческого глаза. Кроме того, этот светофильтр может быть контрастирующим светофильтром для синих или оранжево-красных структур объекта, так как спектрограмма в этих областях показывает сильное уменьшение чувствительности фотографических материалов.

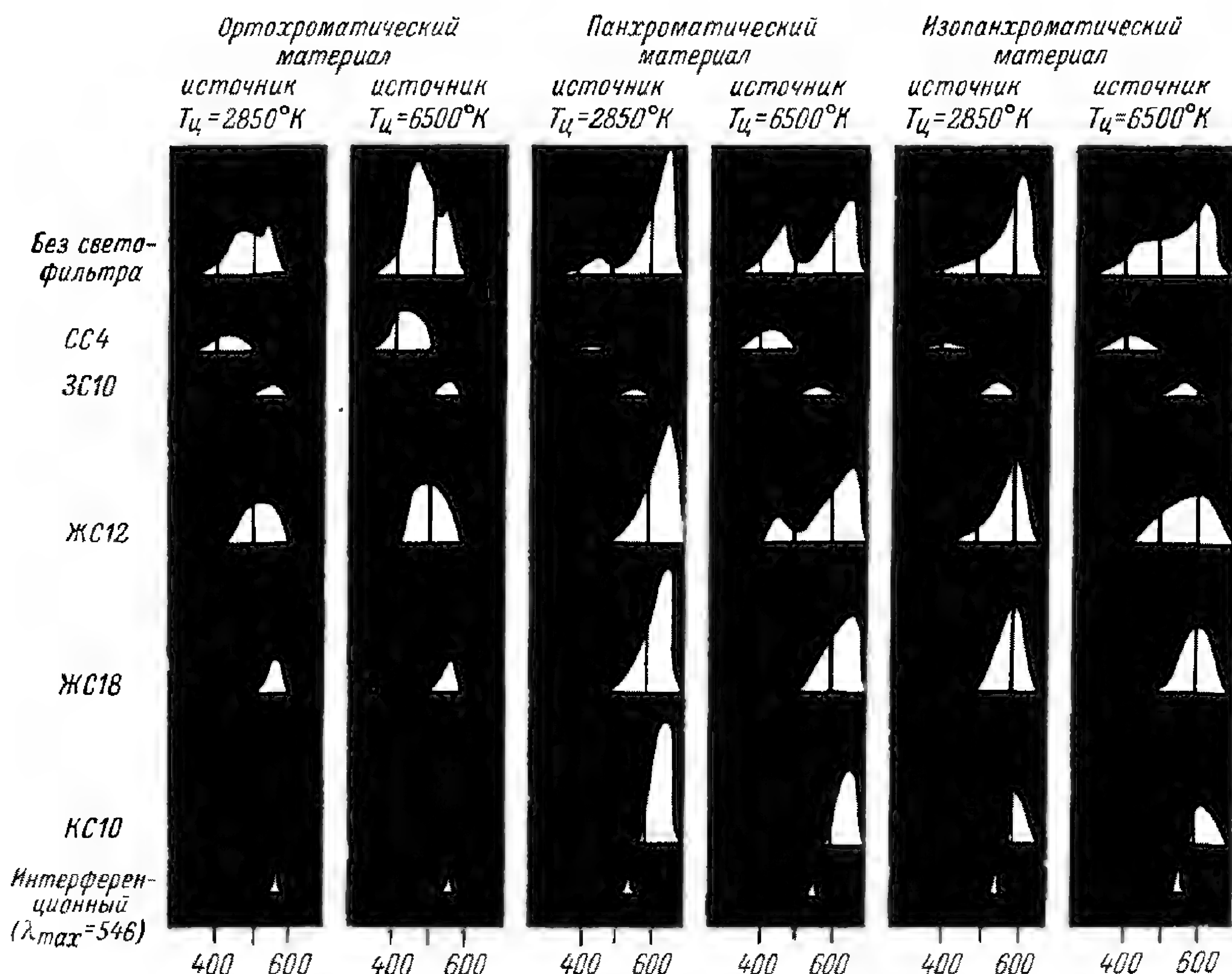


Рис. 142. Спектрограммы различных фотоматериалов и светофильтров для источников с разными цветовыми температурами $T_ц$.

Светофильтр ЖС12 в сочетании с ортохроматическим материалом может применяться как компенсационный. Для панхроматического материала он является контрастирующим для голубых по цвету структур. Светофильтр ЖС18 в сочетании с ортохроматическим материалом может служить селективным фильтром, так как обладает крутой границей пропускания с коротковолновой стороны спектра, а крутая длинноволновая граница спектрограммы обусловливается ортохроматической сенсибилизацией этого материала. Для панхроматического и изопанхроматического материалов этот светофильтр может быть либо контрастирующим, либо селективным. Как следует из рисунка, проводить съемку с красным светофильтром КС10 на ортохроматическом материале бессмысленно. Для панхроматических и изопанхроматических материалов этот светофильтр применяется в основном как селективный.

5. ВЫБОР ЧЕРНО-БЕЛЫХ ФОТОГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Основные характеристики черно-белых фотоматериалов приведены в табл. 14. Выбор фотографического материала для микрофотографии определяется главным образом освещенностью, контрастом и окраской фотографируемого объекта. Основным критерием для выбора фотома-

ТАБЛИЦА 14

Характеристики некоторых черно-белых фотоматериалов *

Наименование	$S_{0.2}$ в единицах ГОСТа 2817-50	$S_{0.85}$ в единицах ГОСТа 10691-63	$\gamma_{макс}$	G **	R
Пленки					
Фото-32	22	32	1.20	12	150
Фото-65	65	65	0.80	20	110
Фото-130	180	250	1.0	26	105
Фото-250	350	500	1.0	25	70
Кинонегатив КН-1	16	16	0.70	8	130
Кинонегатив КН-2	32	32	0.80	16	130
Кинонегатив КН-3	90	90	1.70	26	105
Кинонегатив КН-4 (ВЧ)	350	700	1.40	40	110
Кинонегатив А-2	180		1.20		85
Пленка РФ-3	180		1.60	20	65
Изопанхром 18	22	90	2.30		250
Изопанхром 20	90	350	1.70	30	140
Изопанхром 17	130	350	1.90	20	120
Изопанхром 15	250	700	1.90	40	85
Панхром 10Н	350	1000	1.70	30	60
Изопанхром 13	500	1400	1.60	40	65
Кинопозитив МЗ-3 ***	0.5—1.0	4.0	2.8—3.2	16	110
Фонограммная ЗТ-7 ***	2.0	8.0	3.50	12	180
Микрат 300 ***	2.0	11	4.60		300
Астрономическая пленка					
А-500	70				75
А-600	100				75
А-700	120				75
Инфра-810	35		2.30		
Инфра-1030	0.10		2.60		
Пластинки ***					
Изоортохроматические (мягкие, норм., контрастные)		45—180	0.9—2.0 ****		50—60
Изоортохроматические ВЧ		180—250			
Изохроматические (мягкие, норм., контрастные)		45—180	0.9—2.0		50—60
Панхроматические (мягкие, норм., контрастные)		45—180	0.9—2.0		50—60
Изопанхроматические (мягкие, норм., контрастные)		45—180	0.9—2.0		50—60
Репродукционно-штриховые (изоортохром и панхром)		5.5	3.0—4.5		70
Репродукционно-полутоновые (изоортохром и панхром)		8.0	1.3—1.7		80
Диапозитивные		0.5—2.8	1.5—3.0		65—100
Спектрографические					
СП-I		3.0—6.0	1.1		65
СП-ЭС		6.0—10	1.1		65
СП-II		10—15	1.1		65
СП-III		4.5—9.0	1.1		65
УФШ-3 (для УФ области спектра)		10	1.3		85
Микрофотографические		45—130	2.8		65—70
Инфрахроматические 740, 780, 840, 880		5.5—12			

* Характеристики даны для случаев проявления пленок Фото и КН в проявителе № 2 ГОСТ, пленок Изопанхром и Панхром — в проявителе № 1 ГОСТ, Изопанхром 15 — в проявителе УП-2.

** Фактор зернистости G дан для плотности почернения, равной 1.0.

*** Светочувствительность S этих фотоматериалов определена для источника света с $T_ц = 2850°\ K$, остальных — для белого света с $T_ц = 6500°\ K$, инфрахроматических — в белом свете за светофильтром КС-14.

**** Для пластинок приведены коэффициенты контрастности $\gamma_{рек}$.

териала при работе методами ультрафиолетовой, флуоресцентной, темнопольной микроскопии является светочувствительность материала, так как освещенность изображения при этих методах мала. Существенно, что при выборе материалов следует в большинстве случаев исходить из их спектральной чувствительности. Число общей светочувствительности фотоматериала, обозначенное на его упаковке, соответствует освещению материала полным спектром, и поэтому оно не может служить критерием светочувствительности при съемке в узких областях спектра. Это особенно надо иметь в виду при фотографировании в ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра, так как общая светочувствительность фотоматериалов, которая может быть значительно повышена различными сенсибилизаторами, не является показателем его чувствительности в невидимых областях спектра. Некоторые материалы с малой общей чувствительностью более пригодны для фотографирования в УФ лучах, чем материалы с высокой общей чувствительностью. Например, диапозитивные пластинки для съемки в УФ области спектра более выгодны, чем высокочувствительные ортохроматические пластинки, и при длине волны 250 нм обладают такой же чувствительностью, что и негативная пленка типа КН-4.

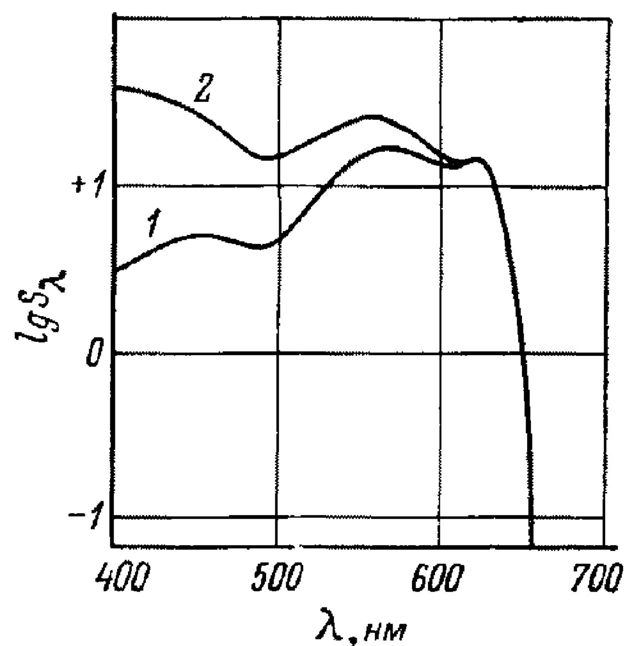


Рис. 143. Спектральная чувствительность изопанхроматического материала при источниках света с температурой $T_ц$, равной 2850° (*1*) и 6500° К (*2*).

Следует иметь в виду, что при изменении цветовой температуры источника меняется светочувствительность фотоматериалов (рис. 143). Это обстоятельство следует учитывать при определении выдержек и кратности светофильтров.

Высокочувствительные материалы, как правило, обладают крупной зернистостью, что ограничивает степень увеличения полученных с них негативов. Например, пленка Панхром 10 позволяет получить фотоотпечатки без заметной зернистости с увеличением при печати не более 3.5×.

Светочувствительность фотоматериала, а при съемках с последующим увеличением негативов и его зернистость определяют в конечном итоге и дозу облучения объекта при микрофотографировании. Это полезно иметь в виду, например, при съемке живых объектов. Доза облучения (количество освещения), получаемая препаратом за время одного снимка, зависит от чувствительности фотоматериала и масштаба изображения и не зависит от яркости источника света, так как с понижением яркости для получения нормального почернения на снимке приходится соответственно увеличивать время экспонирования. Уменьшить дозу можно только повышая светочувствительность фотографического материала и уменьшая масштаб изображения.

Минимальный масштаб определяется, исходя из возможного последующего увеличения негатива при печати с учетом зернистости фотоматериала. Так как освещенность изображения обратно пропорциональна квадрату увеличения, то выдержка, а с ней и доза облучения сокращаются с уменьшением величины G^2/S_λ. Самой мелкозернистой из высокочувствительных пленок является Изопанхром 17. Фотографирование на ней можно вести с довольно малым окулярным увеличением.

Проявление высокочувствительных пленок рекомендуется вести в мелкозернистых проявителях или в проявителях, повышающих светочувствительность фотографических материалов (см. гл. IV).

Для практической работы полезно знать, что фотографические материалы, особенно высокочувствительные, со временем меняют некоторые свои характеристики. Старение фотоматериалов при их хранении обычно проявляется в увеличении вуали и уменьшении светочувствительности и коэффициента контрастности. Для учета таких возможных изменений следует обращать внимание на дату изготовления материала или дату, до которой его рекомендуется проявлять. Гарантийный срок хранения пленок средней чувствительности — 15 мес., пластинок и высокочувствительных пленок — до 12 мес. Фотоматериалы в фабричной упаковке следует хранить в помещении при температуре не выше 17—20 °С и относительной влажности 40—60%. Более низкая температура помещения способствует лучшей сохранности свойств материалов. Инфрахроматические материалы надо хранить в холодильниках при возможно низкой температуре. Перед вскрытием коробки с пленкой, хранившейся в охлажденном месте, ее необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 1 часа во избежание появления дефектов от конденсации влаги.

Несмотря на сравнительно большой гарантийный срок хранения, чувствительность некоторых фотоматериалов особенно быстро падает в течение первых 3—4 мес. со дня изготовления и к концу гарантийного срока может упасть на несколько десятков процентов. Однако по истечении гарантийного срока фотоматериалы все же можно употреблять для работы; возросшую вуаль рекомендуется снижать с помощью антивуалирующих веществ, добавляемых в проявитель.

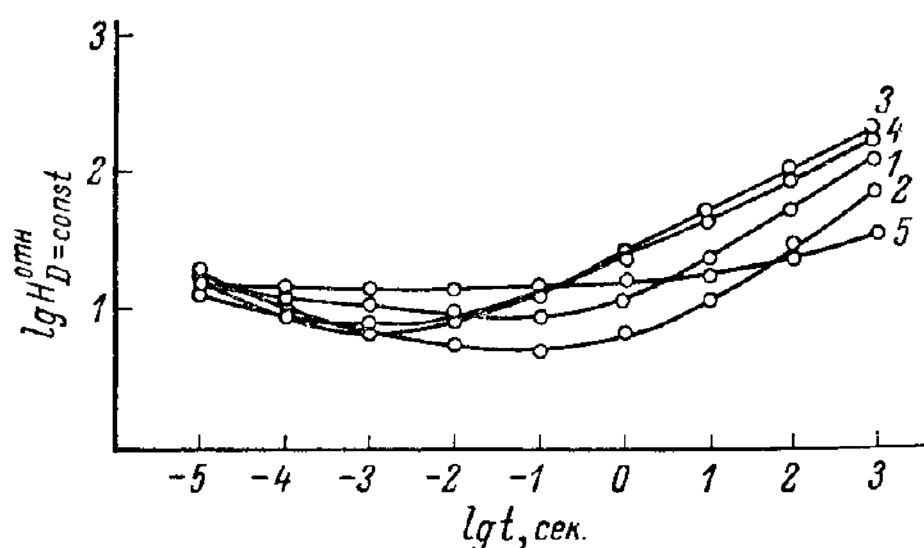


Рис. 144. Изоопаки пленок ЗТ-7 (*1*), Кинопозитива МЗ (*2*), Панхрома 10 (*3*), Кинонегатива МЗ (*4*) А=500 (*5*).

Кроме светочувствительности и зернистости, при выборе фотоматериалов для микрофотографирования слабо освещенных изображений необходимо учитывать явление невзаимозаместимости (см. гл. IV).

Для примера на рис. 144 приведены изоопаки для пленок ЗТ-7, Кинопозитива МЗ, Кинонегатива МЗ, Панхром 10, пленки А-500. Наибольшая чувствительность этих пленок лежит соответственно при выдержках 1/50, 1/10, 1/500, 1/1000 и 1 сек. Наибольшую зависимость светочувствительности от выдержек среди указанных материалов имеет пленка Панхром 10, которая вследствие этого, несмотря на большую чувствительность, мало пригодна для съемки с большими выдержками.

Наименьшей зависимостью светочувствительности от выдержки обладают специально разработанные для этой цели астрономические пленки.

Явление невзаимозаместимости следует учитывать также и при фотографировании с очень малыми выдержками, в частности при работе с импульсными лампами, когда выдержка составляет 10^{-3}—10^{-6} сек. Приведенные на рисунке изоопаки показывают, что и при этих условиях светочувствительность различных материалов меняется в разной степени. Для импульсной фотографии наиболее пригодны пленки Панхром 10, Изопанхром 17, ВЧ, Изопанхром 13.

Разрешающая способность современных фотографических материалов настолько велика, что является вполне достаточной для микрофотографирования с любыми увеличениями. Так как при выборе материалов для съемок слабо освещенных объектов основное внимание обращается на

спектральную чувствительность, то практически не удается варьировать их коэффициент контрастности, который мало отличается у пленок высокой чувствительности.

При фотографировании препаратов, освещенность которых может быть достаточно высокой, целесообразно применять фотоматериалы с большим коэффициентом контрастности, так как контраст изображений микрообъектов в большинстве случаев сравнительно невелик. Здесь рекомендуются материалы средней чувствительности, контрастные и достаточно мелкозернистые. Проявление негативов на малоформатной пленке может производиться в мелкозернистом проявителе, на форматных материалах — в контрастно работающем проявителе, например проявителе Чибисова.

Выбор типа фотоматериала определяется в основном окраской объекта, с учетом примененного светофильтра. Съемку в УФ и синих лучах удобно проводить на несенсибилизированных материалах, которые можно обрабатывать при красном свете. При съемке большинства окрашенных препаратов часто применяются изоортохроматические материалы, так как красный цвет в изображении этих объектов встречается сравнительно редко. Если же в изображении красные цвета присутствуют, то рекомендуются панхроматические и изопанхроматические материалы. Эти фотоматериалы могут заменять также несенсибилизированные и изоортохроматические материалы.

В микрофотографии чаще применяют 35-мм пленки. Это объясняется в первую очередь их широким ассортиментом, распространенностью и удобствами съемки и обработки. Фотографирование на 35-мм пленку позволяет получать удовлетворительное качество изображения и облегчает работу при массовых съемках, чередующихся с визуальным наблюдением объектов. Однако следует учитывать, что увеличение негативов при проекционной печати сопровождается некоторым снижением резкости изображения. Поэтому для особенно ответственных работ следует рекомендовать форматные пленки и пластинки с последующей контактной печатью. Последний способ позволяет сэкономить время, когда по каким-либо причинам (например, дефекты в препарате, ошибки в настройке прибора, неисправности прибора и др.) снимок оказался неудачным: проявление одного негатива сразу может заставить исследователя устранить причину неудачного снимка и только затем перейти к съемке следующих.

На крупноформатных негативах значительно легче оценивать качество изображения, особенно его мелких деталей, и в случае необходимости возможна их ретушь.

Конкретные рекомендации по выбору фотоматериалов для микрофотографирования разными методами будут даны в последующих главах.

Позитивная печать на фотографическую бумагу или пленку (при изготовлении диапозитивов) производится контактным или проекционным способом.

Контактная печать в противоположность проекционной не снижает резкости изображения негатива, но зато не позволяет изменять масштаб изображения и его кадрирование. Она применяется обычно для печати с пластинок или форматных пленок. При печати необходимо тщательно следить за чистотой негативов. Малейшие точки, подтеки, следы капель, пылинки на негативе становятся хорошо заметными и снижают качество изображения. Перед работой необходимо тщательно, но осторожно протереть негатив с глянцевой стороны, а эмульсионный слой очистить от пыли мягкой кистью или сдуванием резиновой грушей.

Фотобумаги, предназначенные для печати, различаются контрастностью (табл. 15). Характер поверхности бумаги влияет на контрастность и максимальное почернение изображения. Так, глянцевые бумаги примерно на 40% контрастнее матовой бумаги того же номера.

ТАБЛИЦА 15

Классификация бромсеребряных фотобумаг по контрастности

Обозначение контрастности фотобумаги	Номер контрастности фотобумаги	Широта	Максимальный коэффициент контрастности $\gamma_{макс}$ для глянцевой бумаги	Назначение
Мягкая	1	1.6—1.8	1.1—1.2	Для очень контрастных негативов
Нормальная	2	1.3—1.5	1.3—1.5	Для контрастных негативов
»	3	1.1—1.2	1.6—1.9	Для нормальных негативов
Контрастная	4	0.9—1.0	2.0—2.4	Для негативов пониженного контраста
»	5	0.7—0.8	2.5—2.9	Для мягких негативов
Особоконтрастная	6	0.5—0.6	3.0—3.9	Для вялых негативов
Сверхконтрастная	7	до 0.4	4.0	Для очень вялых негативов

Самой существенной характеристикой фотобумаги является степень ее контрастности, определяющая выбор бумаги для печатания. Как правило, на фотографии стремятся передать все детали, имеющиеся на негативе. Поэтому номер бумаги подбирают, исходя из характера негатива. Для контрастных негативов, имеющих большой интервал плотностей, подбирают мягкую фотобумагу с большой широтой, и наоборот. С контрастного негатива не следует печатать на бумагу средних и больших номеров по двум причинам: во-первых, полезная широта этих бумаг меньше интервала почернений негатива и, следовательно, не все детали негатива будут переданы на отпечатке; во-вторых, контраст изображения окажется неестественно большим.

Ошибки в выдержках при печати в некоторой степени можно компенсировать изменением времени проявления (передержанный позитив проявляют несколько меньше). При работе с наиболее распространенной фотобумагой Унибром выдержка должна быть такой, чтобы проявление закончилось в 2—2.5 мин. Варьируя в некоторых пределах время проявления, можно также несколько изменить контраст изображения.

Качество изображения на снимке в некоторой степени зависит от соотношения между освещенностью бумаги и временем ее экспонирования. Так, прозрачные негативы со слабо выраженными деталями требуют очень небольшой освещенности при печати и соответственно продолжительной выдержки. В этом случае при малых освещенностях будет прорабатываться большее количество деталей. Очень плотные негативы, у которых с трудом просматриваются детали даже в светлых участках, надо печатать с относительно короткой выдержкой, но при сильной освещенности негатива.

Регулировать освещенность при печати можно изменением диафрагмы объектива или накала лампы фотоувеличителя.

Иногда встречаются негативы, отдельные участки которых очень сильно отличаются друг от друга по плотности. Эти участки можно печатать с неодинаковой выдержкой, затеняя соответствующие части изображения маской из черной бумаги или рукой. Во избежание появления на фотографии резкой границы от края маски последнюю в процессе экспонирования надо непрерывно смещать в небольших пределах.

Фокусировку резкого изображения на бумаге следует приводить при полностью открытой диафрагме объектива, на время экспонирования размер диафрагмы несколько уменьшается.

Для проявления фотоотпечатков обычно применяется контрастно и быстро работающий проявитель, например проявитель Чибисова.

6. ВЫБОР ЦВЕТНЫХ ФОТОГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

В табл. 16 приведены характеристики отечественных цветных фотографических материалов. Наряду с ними часто применяются также цветные обратимые пленки Орвоколор дневного света UT16 (чувствительностью 22 ед. ГОСТа) и UT21 (около 90 ед ГОСТа) и искусственного света UK14 (16 ед. ГОСТа). Следует отметить также обратимую пленку Полаколор (чувствительность свыше 45 ед.) фирмы Полароид Ленд Корпорейшн, так как она создает новые возможности для цветной микрофотографии, позволяя получать позитивные изображения объекта через 1 мин. после экспонирования.

ТАБЛИЦА 16

Характеристики цветных фотографических материалов

Фотоматериал	Назначение	Светочувствительность, $S_{ед.}$ ГОСТа	$T_ц$ источника, для которой рассчитана пленка, °K	Коэффициент контрастности γ	Разрешающая способность R
ДС-3	Негативная	32	6500	0.70—0.80	53
ДС-5	Негативная с маскирующими компонентами	22	6500	0.50—0.70	58
ДС-5М	То же	32	6500	0.65—0.75	58
ЛН-5	»	22	3200	0.50—0.70	58
ЛН-5М	»	32	3200	0.65—0.70	58
ЛН-6	»	32	3200	0.60—0.70	
ЛН-7	»	65—90	3200	0.60—0.70	63 и более
ЦП-3	Позитивная	0.7	3200	1.8—2.2	60
ЦП-7	Позитивная для печати с маскированных негативов	0.1	3200	2.7—3.3	230
ЦП-8	То же	0.4	3200	2.7—3.3	100
ЦП-8Р	»	0.2	3200	2.7—3.3	78 и более
ЦП-10	»	0.3	3200	3.0—3.5	290
ЦО-2	Обратимая	22	6500		45
ЦО-3	»	32	6500	1.4—1.9	45
ЦО-90Л	»	90	3200	1.8—2.2	59
ЦО-32Д	»	32	6500	1.8—2.2	59
Фотоцвет 1	Фотобумага		2850	1.5—2.0	
Фотоцвет 2:					
нормальная	»	5—25	2850	1.8—2.4	55
контрастная	»	5—25	2850	2.5—3.3	55
Фотоцвет 5	»		2850		
Фотоцвет 4:	Для печати с маскированных негативов				
нормальная		3—15	2850	1.8—2.4	55
контрастная		3—15	2850	2.5—3.3	55

Цветные материалы рассчитаны на работу с источниками света определенной цветовой температуры. В противном случае изображение приобретает неестественный цветовой тон. При негативно-позитивном процессе такие цветовые искажения могут быть в некоторой степени ском-

пенсированы подбором коррекционных светофильтров во время печати. Искажения, возникающие на обратимой пленке в случае применения несоответствующих источников, не могут быть исправлены. Однако экспонирование цветной пленки от источника с отличной от оптимальной цветовой температурой можно производить, если применять специальные компенсационные светофильтры.

Пленки искусственного света предназначены для работы с источником с цветовой температурой 3200—3400°*K*, а пленки дневного света — для источников с температурой 5500—6500°*K*. Если при работе с пленкой дневного света применить лампу накаливания, то на позитиве преобладают оранжево-красные тона (рис. 145*, *а*). Наоборот, применяя источник дневного света и пленку искусственного света, получают позитивное изображение с преобладанием синих тонов (рис. 145*, *б*). Если применить в первом случае синий светофильтр, во втором — оранжевый или проэкспонировать пленку от соответствующего ей источника, то можно получить позитив с правильной передачей цветовых оттенков объекта (рис. 145*, *в*).

В практике цветной фотографии встречаются не только указанные выше крайние случаи; часто имеют место небольшие отклонения цветовой температуры источников от номинального значения (например, при изменении режима работы лампы накаливания, как указывалось выше), не говоря уже о том, что цветовые температуры некоторых ламп накаливания ниже требуемых для пленки. Для приведения в соответствие цветовой температуры источника с данной пленкой рекомендуются компенсационные светофильтры, указанные в табл. 17. Такое согласование

ТАБЛИЦА 17

Компенсационные светофильтры для согласования температуры источника света с характеристиками цветных фотоматериалов (в скобках указана толщина светофильтра в мм)

Цветовая температура источника света, °K	Светофильтр	Цветовая температура источника света, °K	Светофильтр
	Для пленок, рассчитанных на $T_{ц}=3200°$ K		
2490	СЗС17 (2.6)+ПС14 (2)	3200	Не нужен
2570	СЗС17 (2.3)+ПС14 (2)	3300	ОС5 (0.05)+ЖСЗ (0.05)
2650	СЗС17 (2)+ПС14 (2)	3400	ОС5 (0.08)+ЖСЗ (0.08)
2720	СЗС17 (1.8)+ПС14 (2)	3500	ОС5 (0.1)+ЖСЗ (0.1)
2800	СЗС17 (1.3)+ПС14 (1)	3600	ОС5 (0.1)+ЖСЗ (0.2)
2850	СЗС17 (1.3)+ПС14 (1.6)	3700	ОС5 (0.15)+ЖСЗ (0.25)
2900	СЗС17 (1)+ПС14 (1)	3800	ОС5 (0.2)+ЖСЗ (0.3)
3000	СЗС17 (0.5)+ПС14 (1)	3850	ОС5 (0.2)+ЖСЗ (0.3)
3100	СЗС17 (0.3)+ПС14 (0.5)	6100	ЖЗС5 (0.5)+ПС8 (0.05)
		6500	ЖЗС5 (0.6)+ПС8 (0.05)
	Для пленок, рассчитанных на $T_{ц}=6000—6100°$ K		
3200	СС1 (2.1) или СС9 (5.5)		
	Для пленок, рассчитанных на $T_{ц}=6500°$ K		
2850	СЗС8 (0.8)+ПС5 (1.9)+ + ПС14 (5.5) или СЗС17 (6.95)+ПС5 (7.4)+ + ПС14 (6.6)		
3200	СЗС17 (5.6)+ПС5 (7.4)+ + ПС14 (5) *		

* Для этих же целей могут применяться желатиновые светофильтры ШФ-1 (производства химзавода, г. Шостка), № 85 (фирмы Кодак), а также стеклянный светофильтр К-14 (фирмы Орво).

практически производится только для обратимых пленок, так как цветовые искажения, обусловленные небольшими различиями в температурах источников света, при негативно-позитивном процессе легко исправляются применением коррекционных светофильтров.

Колебания напряжения питающей сети в пределах 10—15% и соответствующее изменение цветовой температуры на 4—7% от ее абсолютного значения еще не вызывают на снимке существенных цветовых искажений.

Цветовая температура ламп увеличивается с ростом напряжения питания, что иногда можно использовать вместо компенсационных светофильтров при фотографической печати или микрофотографировании. Цветовая температура ламп не зависит от срока их службы.

При выборе фотографических материалов для цветной микрофотографии следует, кроме цветовой температуры источника света, учитывать также освещенность и контраст изображения. Для съемки при малых освещенностях, например во флуоресцентной и темнопольной микроскопии, используются наиболее чувствительные негативные пленки ЛН-7, ДС-5М. Флуоресцентные изображения фотографируются обычно на пленку дневного света. Наилучшее воспроизведение цветов дают пленки с маскирующими компонентами.

Большое распространение в микрофотографии получили обратимые цветные пленки, позволяющие получать диапозитивы без фотографической печати. Цветоделение в них происходит только один раз, благодаря чему вдвое уменьшаются цветовые искажения, обусловленные несовершенством красителей пленок. Изображения на этих пленках имеют более насыщенный цвет, чем на бумажном позитиве. Цветные диапозитивы, отпечатанные с негативной на позитивную пленку, также лучше фотографий на бумаге. Обращаемый цветной процесс позволяет получить лишь один хороший экземпляр изображения, дублирование позитива приводит к понижению качества изображения. При работе с обратимыми пленками предъявляются повышенные требования к правильному выбору источника света, компенсационных светофильтров и выдержки, так как в случае возникновения каких-либо недостатков их впоследствии устранить чаще всего не удается. Наоборот, при негативно-позитивном процессе можно исправлять некоторые дефекты негатива, полученные при его экспонировании или проявлении.

В некоторых случаях, особенно при высокой освещенности и малом контрасте изображения, производить съемку рекомендуется на позитивную цветную пленку, позволяющую существенно повысить контраст изображения. При этом позитивная пленка обрабатывается так же, как негативная. Применять позитивную пленку целесообразно, например, при фотографировании окрашенных биологических препаратов, а также в интерференционной и поляризационной микроскопии.

Как и в случае черно-белых материалов, при цветном микрофотографировании следует учитывать явление невзаимозаместимости, которое к тому же здесь усугубляется тем, что изопаки разных слоев материала отличаются друг от друга. В результате этого с варьированием выдержки изменяется не только светочувствительность фотоматериала, но и нарушается правильная цветопередача. Оптимальная выдержка для пленки дневного света составляет 1/50 сек., для пленки искусственного света — 1/2 сек. Можно считать, что чувствительность и цветовой баланс существенно не изменяются при отклонении выдержки приблизительно на порядок от номинального значения. Искажения, возникающие при больших отклонениях, в некоторой степени могут быть скомпенсированы с помощью компенсационных светофильтров, которые подбираются опытным путем. Длительное экспонирование обратимой пленки искусственного света приводит к преобладанию зеленого оттенка, который можно

устранить с помощью пурпурного светофильтра. С другой стороны, применение импульсного освещения приводит к появлению на пленке дневного света пурпурного оттенка, который компенсируется зеленым светофильтром.

При цветном микрофотографировании используются обычно 35-мм пленки, так как ассортимент форматных пленок невелик, а их обработка менее удобна. Поэтому на форматных материалах рекомендуется производить только наиболее ответственные съемки.

При цветном фотографировании рекомендуется применять как можно меньше светофильтров, потому что они могут исказить цветовой баланс в изображении. По возможности следует применять соответствующие друг другу источники света и цветные фотоматериалы, чтобы не прибегать к компенсационным светофильтрам. Если необходимо пользоваться нейтральными светофильтрами, то их селективность должна быть возможно малой. В этом отношении лучше всего подходит светофильтр НС8 (или NG5 из набора Шотта).

В случае фотографирования на цветные материалы требуется весьма тщательное определение выдержки, что объясняется их малой широтой. Даже незначительные отклонения от оптимальных выдержек могут привести к существенному нарушению цветопередачи, что объясняется разбалансом слоев пленки по чувствительности. С целью экономии времени правильную выдержку можно подобрать путем пробного фотографирования на черно-белую пленку той же чувствительности, что и цветная.

В процессе хранения цветные материалы несколько изменяют свои фотографические свойства. Старение цветных пленок проявляется в уменьшении светочувствительности, коэффициента контрастности и росте вуали. Например, за год хранения пленки ДС-3 ее чувствительность падает в среднем на 20%, коэффициент контрастности на 10%, а вуаль повышается на 15%. Фотографические свойства позитивной пленки в течение года практически не изменяются. Гарантийный срок хранения цветной негативной пленки — 9 мес. Условия хранения материалов те же, что и для черно-белых материалов.

Рецепты растворов и режимы обработки цветных фотоматериалов приведены в гл. IV.

Практические советы по обработке этих материалов сообщаются ниже. Для обеспечения высокого качества цветного изображения полезно знать следующее.

Реактивы должны храниться в герметической упаковке. Раствор проявителя в стеклянном сосуде с притертой пробкой сохраняет свои свойства несколько недель. В процессе работы растворы истощаются. Можно считать, что в 1 л цветного проявителя без заметного изменения его фотографических свойств можно проявить около 10 м негативной кинопленки или около 30 форматных негативных пленок размером 9×12 см. Так как готовый цветной проявитель быстро окисляется, то его рекомендуется хранить в виде двух растворов, смешиваемых в одинаковых пропорциях перед работой. Сохраняемость цветного проявителя, бывшего в употреблении, еще меньше. В процессе работы цвет проявителя становится темно-бурым, а отбеливающего раствора зеленым. Для более экономного расходования растворов и лучшего поддержания постоянства их свойств при длительной непрерывной работе целесообразно по мере истощения растворов периодически добавлять в них свежие порции.

Если пленка при рассматривании ее на просвет имеет желтовато-оранжевую окраску и не совсем прозрачна, то отбеливание и фиксирование пленки рекомендуется повторить.

Фиксирующий раствор можно хранить очень долго. В 1 л фиксажа можно обработать 20 м негативной кинопленки или около 60 форматных негативных пленок размером 9×12 см.

При обработке цветных материалов необходимо соблюдать температурный режим проявления. В летнее время, когда затруднено пользование водой заданной температуры, для предохранения цветных материалов от сползания эмульсии их рекомендуется дубить, например в 1%-м растворе формалина. Для этой цели экспонированная пленка перед ее проявлением размачивается 2—3 мин. в воде, выдерживается 2—3 мин. в растворе формалина и промывается в течение 5 мин. Образующаяся в результате дубления небольшая цветная вуаль может быть скомпенсирована с помощью коррекционных светофильтров при печати с негатива. Дубление обратимых пленок производить не рекомендуется.

Как уже указывалось, при фотографической печати для получения правильной цветопередачи применяются коррекционные светофильтры. Наиболее распространен набор из 33 светофильтров трех цветов — желтого, пурпурного и голубого. Светофильтры одного цвета отличаются друг от друга плотностью. Практически печать производится следующим образом. Определяется выдержка, для чего делаются пробные отпечатки с различными экспозициями. Правильная цветопередача на них, как правило, нарушена. Устранить нежелательный оттенок на отпечатке можно, подбирая коррекционный светофильтр того же цвета, что и преобладающий цветовой оттенок. Чем интенсивнее этот оттенок, тем большей плотности светофильтр применяется для его устранения. Оценку качества пробных отпечатков и готовой копии производят только при дневном свете. Качество получаемого цветного изображения зависит не только от надлежащего выбора светофильтров, но и от правильной выдержки при печати. При определении выдержки нужно учитывать, что применение желтых светофильтров с плотностями до 50% требует увеличения выдержки на 10%, при плотности от 50 до 100% выдержку необходимо увеличить еще на 10%. При использовании пурпурного или голубого светофильтра выдержка увеличивается на величину плотности светофильтра. Кроме того, за счет стекла светофильтра величину выдержки необходимо повысить еще на 20%. Для расчета выдержки при печати с коррекционными светофильтрами существуют специальные таблицы.

Напряжение питания лампы накаливания увеличителя должно поддерживаться неизменным с точностью до 4—5%, чтобы не допустить больших изменений яркости и цветовой температуры лампы.

7. ЭКСПОНОМЕТРИЯ

Нормальная плотность негатива получается при правильно подобранном времени экспонирования (выдержки), на которое влияют следующие факторы:

1. Яркость источника света, определяющая освещенность изображения. Яркость различных применяемых в микрофотографии источников колеблется в широких пределах (см. гл. III). Надо заметить, что освещенность изображения зависит от колебаний напряжения сети питания лампы и стабильности положения светящегося тела.

2. Светочувствительность применяемых фотографических материалов. Однако, как сообщалось в гл. 4, чувствительность вследствие явления невзаимозаместимости сама зависит от величины выдержки.

3. Кратность светофильтров (см. стр. 157 и далее).

4. Масштаб изображения, а также апертура объектива и конденсора (см. стр. 133 и далее).

5. Потери света в оптической системе микроскопа.

6. Свойства объекта и метод его исследования (см. гл. II).

При фотографировании абсорбирующих объектов в светлом поле выдержка тем длительнее, чем плотнее объект. Основное правило для выбора выдержки можно сформулировать следующим образом: на негативе должны быть проработаны темные участки объекта, тогда светлые участки получатся сами. Однако в некоторых случаях выдержки подбираются по наиболее важным структурам объекта.



Рис. 146. Кассета со шкалой на крышке (*а*) и мультипликатор с кассетой (*б*).

Определив время экспонирования t_0 для объекта какого-либо типа, можно подсчитать выдержку для фотографирования этого объекта на том же приборе при изменении условий съемки по формуле

$$t = t_0 \quad k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4,$$

где k_1, k_2, k_3 и k_4 — соответственно коэффициенты, обусловленные кратностью светофильтра, масштабом изображения, численной апертурой, чувствительностью фотографического материала. Для наглядности приведем такой пример. Выдержка t_0, соответствующая определенным условиям фотографирования, равна 10 сек. Параметры изменились следующим образом:

1) вместо зеленого светофильтра с кратностью 6 введен желтый светофильтр с кратностью 3, тогда $k_1 = 3/6$;

2) объектив 10×0.30 заменен объективом 30×0.90; коэффициент изменения масштаба $k_2=30^2/10^2$; коэффициент изменения апертуры $k_3=0.30^2/0.90^2$.

3) выбран фотоматериал с чувствительностью в 3 раза выше, чем первоначальный; $k_4=1/3$; новое время экспонирования будет

$$t = 10 \cdot 3/6 \cdot \frac{900}{100} \cdot \frac{0.09}{0.91} \cdot 1/3 = 1.5 \text{ сек.}$$

На практике выдержку подбирают с помощью пробных снимков или измерением специальным экспонометром.

Для первого способа предлагаются такие варианты.

1. При работе с 35-мм пленкой получают серию снимков с одного и того же участка препарата (каждая следующая выдержка в два раза больше предыдущей). По серии негативов выбирается правильная выдержка.

2. Для съемки с форматными материалами существуют кассеты, на крышках которых нанесена шкала (рис. 146, *а*). Перед экспонированием крышку полностью открывают. После выдержки 1 или 1/100 сек. (см. табл. 18) крышку вдвигают на одну ступень и производят экспони-

ТАБЛИЦА 18

Значение выдержек для экспонирования с градуированной кассетой

Очередность выдержек	Время экспонирования для ступеней, сек						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2		1	1	1	1	1	1
3			2	2	2	2	2
4				4	4	4	4
5					8	8	8
6						15	15
7							30
Суммарная выдержка . . .	1	2	4	8	16	30	60
1	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
2		1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100
3			1/50	1/50	1/50	1/50	1/50
4				1/25	1/25	1/25	1/25
5					1/10	1/10	1/10
6						1/5	1/5
7							1/2
Суммарная выдержка . . .	1/100	1/50	1/25	1/10	1/5	1/2	1

рование в соответствии с таблицей. Соответствующим образом экспонируют последующие ступеньки. В случае отсутствия шкалы ее можно нанести на крышку самим, используя подходящую краску, а также трафарет или линейку. Правильную выдержку определяют по ступеньке негатива с оптимальной плотностью.

3. Пробные снимки на форматном материале можно получить также с мультипликатором (рис. 146, *б*), представляющим собой светонепроницаемый подвижный держатель для кассеты с установленной перед ним

неподвижной щелью. Держатель с кассетой устанавливают в крайнее положение и производят экспонирование первой ступени. Затем держатель перемещают на одну ступень и дается выдержка, вдвое большая предыдущей. Аналогичную операцию повторяют для всех ступеней.

4. Иногда пользуются вкладышами, устанавливаемыми перед кассетой и имеющими вырезы определенной формы и размеров. С помощью таких вкладышей можно производить экспонирование различных участков пластинки при разных выдержках.

5. Если первые четыре приема требуют серии последовательных экспонирований, то с помощью ступенчатого ослабителя, устанавливаемого перед кассетой, выдержка производится один раз. При этом на негативе образуется несколько ступенек различного почернения.

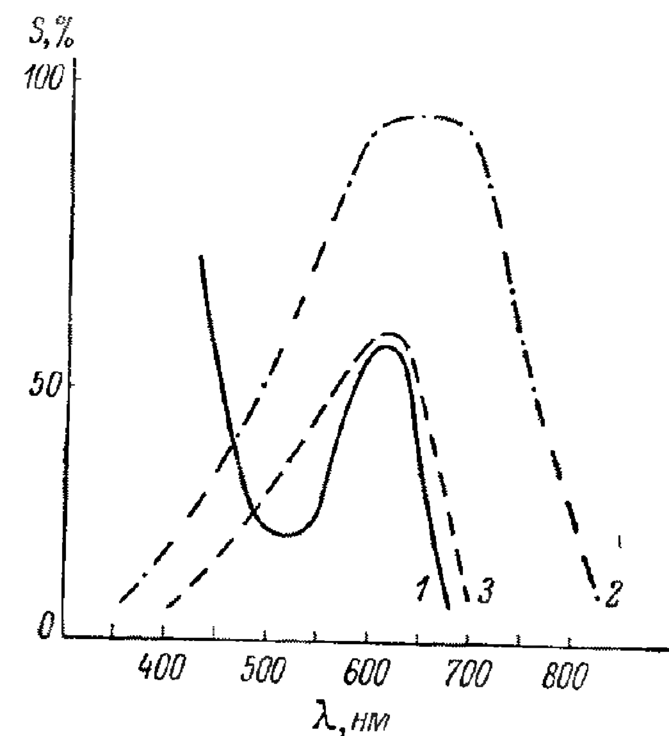


Рис. 148. Зависимость относительной чувствительности (в %) от длины волны.

1 — изопанхроматический фотоматериал (пленка КН-1); 2 — фотосопротивление СФ2-2; 3 — то же сопротивление со светофильтром ЗС8.

Если кассета с градуированной крышкой и вкладыш пригодны в основном для определения выдержек при съемке гомогенных объектов, то остальные приемы применяются во всех случаях.

Микрофотографии, иллюстрирующие определение выдержки (пункты 2—5), представлены на рис. 147*.

Способ определения выдержки с помощью пробных снимков сопряжен с затратой времени и не рекомендуется при съемке объектов, быстро изменяющихся по каким-либо причинам или живых объектов.

Процесс определения выдержки значительно облегчается при наличии экспонометра. Полезно отметить следующую специфику применения экспонометров. Для правильного определения выдержки спектральная чувствительность фотоэлектрического приемника, строго говоря, должна соответствовать спектральной чувствительности фотоматериала. Практически для осуществления этого перед экспонометром помещается соответствующий светофильтр. На рис. 148 приведены кривые спектральной чувствительности изопанхроматического материала (*1*), фотосопротивления (*2*) и этого же фотосопротивления в сочетании со светофильтром ЗС8 (*3*). Кривая *3* почти совпадает с кривой *1*, особенно если фотографирование ведется с зеленым светофильтром, срезающим область синей чувствительности фотоматериала. Если фотосопротивление применять без светофильтра, то измеренные экспонометром выдержки будут заниженными.

При работе с сильно контрастирующими светофильтрами целесообразно выдержку измерять без светофильтра, а затем делать поправку на кратность светофильтра.

Следует заметить, что показания экспонометра не учитывают явление невзаимозаместимости фотоматериалов.

8. НЕКОТОРЫЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ИЗ ПРАКТИКИ МИКРОФОТОГРАФИИ

В практике микрофотографии часто приходится сталкиваться с целым рядом вопросов, не отраженных в предыдущих параграфах. Некоторые из этих вопросов освещены ниже. На первый взгляд они могут казаться

малосущественными, однако их надлежащее решение способствует получению микрофотографий высокого качества.

В первую очередь нужно сказать несколько слов об объектах. Иногда дифракция на краях объекта, а также структура поверхностного слоя затрудняют изучение внутреннего строения этого объекта. Такие нежелательные явления рекомендуют устранять погружением объекта в иммерсионную жидкость с показателем преломления, близким показателю преломления оболочки изучаемой структуры (рис. 149*).

Другой пример. В некоторых растительных объектах межклеточные пространства заполнены пузырьками воздуха. Световые явления на поверхности этих пузырьков не дают возможности наблюдать структуру ткани (рис. 150*, *а*). Если нет соответствующей аппаратуры, то для удаления пузырьков рекомендуют следующую операцию. Инфильтруемую жидкость с объектом помещают в шприц, из которого вытесняют воздух. Затем, закрыв отверстие шприца, вытягивают поршень. Благодаря создавшемуся вакууму пузырьки воздуха улетучиваются из объекта. Микрофотография очищенного от воздуха объекта приведена на рис. 150*, *б*.

Необходимо предупредить, что освещенность изображения, как правило, нельзя регулировать изменением накала лампы или диаметра апертурной диафрагмы. Первое влечет за собой изменение окраски поля зрения, что особенно важно при цветном фотографировании, второе сказывается на контрасте изображения и разрешающей способности прибора. Для изменения освещенности пользуются нейтральными светофильтрами или матовыми стеклами.

При работе с малыми увеличениями не всегда удается добиться равномерного освещения поля зрания. Для выравнивания освещенности можно пользоваться не только матовыми стеклами (об этом говорилось выше). Выравнивания можно достигнуть, если матировать колбу лампы. Для этого ее следует потереть, слегка нажимая, о наждачную бумагу. При этом лампу надо держать в тряпке, чтобы предохранить руку от поранения.

Здесь следует также отметить, что стабильность светового потока, или яркость источника, в процессе работы имеет в некоторых случаях очень большое значение. Световой поток электрических источников излучения, питающихся от сети переменного тока, модулируется с частотой 100 гц. У ламп накаливания сравнительно небольшой мощности глубина модуляции потока составляет около 25%; она уменьшается с увеличением мощности лампы. Газоразрядные источники света дают поток, промодулированный практически на 100%. Это обстоятельство может вредно сказаться при выдержках менее 1/25 сек.; если время экспонирования совпадает с минимумом освещенности, то негатив получится недодержанным. В тех случаях, когда требуются малые выдержки, для исключения модуляции светового потока лампу питают постоянным током.

Исключение различных внешних воздействий на микроскоп в процессе фотографирования представляет собой довольно сложную проблему, доставляющую порой много хлопот экспериментаторам. К таким воздействиям в первую очередь относятся внешние вибрации, а также те толчки, перемещения и другие усилия, которые прикладываются к прибору во время работы. Все эти явления приводят к тому, что образованное микроскопом изображение нестабильно во времени: оно либо смещается в сторону, либо становится нерезким из-за расфокусировки микроскопа. Как то, так и другое может происходить за счет перемещений механизмов, смещения одних элементов прибора относительно других или вибраций отдельных частей.

Борьба за уменьшение влияния внешних вибраций производится в основном по двум направлениям: применение различных амортизаторов и уменьшение нагрузок на предметный столик и тубус микроскопа. Иногда предлагают даже такие меры, как размещение затвора не в фотокамере, а в осветительной системе прибора. В тех случаях, когда это возможно, затвор монтируется в специальной амортизированной оправе.

В качестве амортизаторов применяют пружины, профильные детали из резины или упругих пластических материалов и прокладки из губчатой резины. Последнее средство наиболее доступно и достаточно эффективно, поэтому его можно рекомендовать для самостоятельного употребления.

На лист губчатой резины следует установить массивное металлическое основание, которое будет служить подставкой под микроскоп. Иногда достаточно на резину устанавливать непосредственно микроскоп, не прибегая к дополнительной подставке. Резина не должна полностью сжиматься под тяжестью прибора, а иметь достаточный запас упругости, чтобы прибор мог покачиваться. После окончания работы прибор необходимо снимать с резины (для продления срока службы последней). Предложенный способ дает хорошие результаты даже при работе с интерференционными приборами, которые особенно чувствительны к вибрациям.

С целью уменьшения нагрузки на тубусодержатель (особенно если он не очень жесткий) фотонасадку устанавливают не на тубусе микроскопа, а на специальном кронштейне над ним, подобно тому как было описано и показано на рис. 134 в случае работы с обычным фотоаппаратом. При этом необходимо следить за хорошим совпадением оптических осей микроскопа и фотонасадки. Подобный прием также уменьшает влияние внешних вибраций.

Следует осторожно и аккуратно обращаться с приборами во время работы. Пользоваться препаратоводителем, взводить затвор, перематывать пленку и производить другие манипулирования нужно плавно, без рывков и толчков. Например, для спуска затвора и производства выдержки полезно пользоваться тросиком.

Изредка в практике встречается необходимость съемки через окуляр, снабженный сеткой того или иного вида. В таких случаях процесс фокусировки прибора отличается от обычного и выполняется следующим образом. Перемещая глазную линзу окуляра, добиваются резкого изображения сетки окуляра в плоскости матового стекла камеры или в плоскости сетки визирной трубки. При работе, например, с фотонасадкой эту операцию можно выполнить лишь последовательным приближением, так как доступ к окуляру микроскопа, когда на нем установлена насадка, невозможен. При этом следует заметить, какова резкость изображения сетки, снять насадку, немного переместить глазную линзу окуляра и опять установить насадку. Повторив операцию несколько раз, можно добиться резкого изображения сетки. В остальном фокусировка микроскопа производится обычным способом.

Бывают случаи, когда даже после тщательной настройки прибора изображение на снимке получается нерезким. Это может быть вызвано нарушением согласованного положения плоскостей фотоэмульсионного слоя и сетки визирной трубки, с помощью которой производится фокусировка. Чтобы убедиться в этом, надо, сняв кассету (или заднюю крышку пленочной камеры), положить матовое стекло так, чтобы его матированная поверхность совпадала с плоскостью фотоэмульсионного слоя. Затем прибор фокусируется с помощью визирной трубки так, как указывалось выше: открыть затвор, сфокусироваться с помощью лупы на матовую поверхность и проверить резкость изображения объекта на ней.

Встречаются такие недостатки приборов, проявление которых по незнанию относят к дефектам фотографирования. Примером могут служить блики в поле зрения от оптических деталей или оправ. На рис. 151* представлена микрофотография с заметным бликом в центре.

Наличие блика обусловлено конструкцией оптических элементов, участвующих в съемке; только сменив их, можно избавиться от этого недостатка. Блик бывает также следствием плохого чернения внутренних поверхностей тубуса или оправ линз. Его появление вполне вероятно. например, в редких случаях съемки без окуляра.

Надо сказать, что оценка качества фотографии зависит и от ее эстетического восприятия. Вопрос композиции снимка (т. е. форма и размеры фотографии, ориентация на ней элементов изображения и т. п.) решается в основном на основании опыта. Но во всех случаях не следует допускать в поле зрения царапины, поврежденные элементы объекта, посторонние включения, грязь и другие артефакты.

Полезно напомнить о необходимости бережного обращения с приборами, надлежащего ухода за ними и содержания их в чистоте. Это не только способствует сохранности приборов и продлению их срока службы.

Хорошее состояние прибора — одно из необходимых условий получения микрофотографии высокого качества. Например, микроскоп, в механизмах которого образовались большие люфты, может не обеспечить стабильной фокусировки.

Грязь, пыль, царапины и другие дефекты на поверхностях оптических деталей приводят к появлению рассеянного света, а в некоторых случаях проявляются в том или ином виде на фотографиях. Дефекты на поверхностях, сопряженных с предметной плоскостью, неизбежно проектируются в поле зрения. Например, на рис. 152* видна царапина на поверхности светофильтра, помещенного вблизи полевой диафрагмы осветителя. Можно еще сослаться на рис. 127*, где заметна грязь на нижней поверхности предметного стекла, которая проектируется в поле зрения благодаря большой глубине резкого изображения. Из сказанного напрашивается вывод, что светофильтры целесообразно помещать по возможности ближе к апертурной диафрагме. Размещение светофильтра вблизи апертурной диафрагмы предпочтительней, так как при помещении его вблизи полевой диафрагмы грязь, пыль, царапины или другие дефекты, встречающиеся на поверхности фильтра, будут в какой-то мере проявляться в поле зрения. Однако следует оговорить, что матовое или молочное стекло, помещенное около конденсора, не дает возможности настроить освещение по Кёлеру.

Дефекты на поверхностях, удаленных от предметной плоскости, становятся заметными на фотографии при малых выходных зрачках микроскопа, т. е. когда увеличение достигает тысячи и более апертур. Это имеет место при съемке с завышенным масштабом изображения или с излишне прикрытой апертурной диафрагмой. Наличие пыли на линзах окуляра или другие дефекты проявляются на фотографии в виде дифракционной или теневой кратины. Такие дефекты можно видеть также на рис. 152*.

Особенно нежелательны дефекты на предметном и покровном стеклах, а также на поверхности объекта при работе по методу темного поля. Свет, рассеянный дефектами, снижает контраст изображения, а контуры дефектов могут поблескивать в поле зрения, создавая ложное впечатление об объекте (см., например, рис. 169*).

Обычно не принято чистить внутренние поверхности приборов, но это не должно относиться к фотокамере с мехом. Дело в том, что при работе в такую камеру засасывается пыль, которая впоследствии может оседать

на поверхности оптических деталей. Смахивать пыль следует мягкой беличьей кисточкой.

Чистку оптических деталей рекомендуется производить с помощью хорошо выстиранной салфетки из фланели или ватного тампона, намотанного на тонкую палочку. Для удаления с поверхности подтеков и жирных пятен салфетку или тампон слегка смачивают в бензине или ксилоле. Применяют также спирт, но он может испортить оптическую систему, если просочится внутрь конденсора, объектива или окуляра.

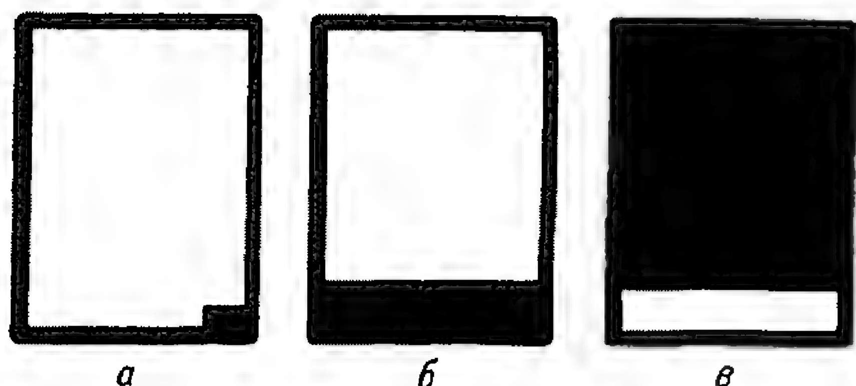


Рис. 153. Рамки для фотопечати.

Проверяют чистоту поверхности таким образом: дыхнув на нее, смотрят в отраженном свете, насколько быстро улетучивается сконденсировавшийся на ней пар. Если поверхность чистая, то влага сходит почти одновременно со всей площади.

По окончании работы с иммерсионной жидкостью, ее необходимо сразу удалить со всех оптических деталей. Водную иммерсию снимают фильтровальной бумагой, а затем, если это требуется, поверхности чистят салфеткой или ватным тампоном. Масляную иммерсию удаляют ваткой, а детали протирают смоченной в бензине или ксилоле салфеткой.

Фотопластинку перед зарядкой в кассету целесообразно протереть мягкой кисточкой из верблюжьей шерсти для удаления пыли и ворсинок, наличие которых может привести к необходимости пересъемки объекта.

Образец регистрационной карточки

Препарат № *305, гранит*		№ *1937*
Прибор: *микроскоп МИН-8*; *микрофотонасадка* МФН-12		
Объектив: *9×0.20, планахроматический*	Окуляр: *8×, компенсационный*	Дополнительное увеличение прибора: *0.5*
Метод исследования: *ортоскопия в поляризованном свете*		
Источник света: *лампа СЦ-61, 8 в, 20 вт*		Светофильтр: *ЗС10 (2 мм)*
Фотоматериал: *Изопанхром 18*		Экспозиция: *2 мин.*
Проявитель: *мелкозернистый*		Время проявления: *20 мин.*
Масштаб изображения: *негатив — 34×, позитив — 80×*		
Дополнительные сведения: *поляризаторы скрещены, пластинка компенсационная, красная I порядка*		Дата: *18.X.1970*

Микрофотография — это не только средство иллюстрирования выполняемых работ. Это важный метод исследования микроскопических объектов, их строения, физических свойств и химического состава. Поэтому можно рекомендовать не только тщательно проводить весь процесс фотографирования, но также оформлять результаты работы надлежащим образом.

На всех фотографиях полезно проставлять масштаб изображения. Делать это можно двумя способами: 1) фотобумага закрывается с рамкой с внутренним выступом (рис. 153, *а*), под которым на фотографии по-

лучается белая площадка; затем на площадку наносится масштаб, как это сделано для большинства иллюстраций данной книги; 2) экспонирование бумаги производится сначала через рамку с большим окном (рис. 153, *б*), куда впечатывается изображение препарата, а затем через рамку с узкой щелью (рис. 153, *в*), через которую проектирует изображение объект-микрометра в том же масштабе, что и изображение препарата. Пример такого оформления приведен на рис. 164*. Нанесение масштаба непосредственно на изображение объекта может испортить общий вид фотографии.

Сохранять фотографии и особенно негативы целесообразно в специальных фильмотеках, снабженных соответствующей картотекой. Образец карточки с указанием условий съемки микрофотографии рис. 164 *а* приводится на стр. 176. Подобные карточки легко изготовить самому, отпечатав их на пишущей машинке.

Препараты, подлежащие хранению, рекомендуется маркировать, приклеивая к ним этикетки с номером. При наличии хорошо организованного архива можно в случае необходимости повторить съемку даже спустя много времени.

Возможные ошибки при микрофотографировании и способы их устранения даны в приложении II.

Глава VI

РАЗЛИЧНЫЕ ВИДЫ МИКРОФОТОГРАФИРОВАНИЯ

§ 1. МИКОРОФОТОГРАФИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

1. Фотографирование окрашенных препаратов

Так как большинство биологических объектов прозрачно в видимой области спектра, то для выявления их структуры препараты обычно окрашивают или подвергают специальным реакциям, придающим объекту те или иные оттенок и контраст.

Трудно дать строго определенные рекомендации по подбору фильтров для каждой гистологической окраски и гистохимической реакции. Оттенки цвета структур в одинаковых препаратах, обработанных по одной и той же методике, могут быть весьма различными в зависимости от качества красителей и условий проведения окраски. Поэтому изображения таких препаратов могут иметь неодинаковый контраст, а это скажется на выборе светофильтров. Кроме того, в ряде случаев возникает необходимость выделить или, наоборот, ослабить контраст и яркость изображения тех или иных образований в препарате, и это также повлияет на выбор светофильтров в каждом отдельном случае.

Как правило, для большинства реакций и окрасок, дающих сине-фиолетовые или красные тона, целесообразно применять зеленые светофильтры — ЗС1, ЗС2, ЗС3, ЗС6. Однако при резком преобладании в препарате красных и фиолетовых тонов над синими и голубыми используют оранжевые или желтые фильтры (ОС5, ОС11, ЖС18). Это несколько ослабляет контрасты изображения, но дает возможность полнее представить на снимке структуры объекта (например, при окраске метиловым зеленым пиронином, по Романовскому-Гимзе и др.).

Окраски и реакции, дающие черно-белую окраску (гематоксилиновые лаки, черный судан, разные виды импрегнации серебром, осмием и др.), можно фотографировать без светофильтра или с зелеными и синими светофильтрами что несколько усиливает контраст изображения. Препараты с преобладанием светло-синих и голубых тонов (например, при окраске метиленовым синим) целесообразно фотографировать через оранжевые светофильтры.

При фотографировании препаратов, окрашенных тионином, толуидиновым синим и другими синими красителями, которые дают красноватый метахроматический оттенок, чаще всего используют зеленые светофильтры.

В табл. 19 даны некоторые рекомендации по выбору светофильтров для фотографирования. Для окрашенных препаратов пригодны изо-ортохроматические фотоматериалы. Из форматных материалов наилучшими являются пластинки Микрофотографические и Репродукционные изо-

ТАБЛИЦА 19

Некоторые рекомендации по выбору светофильтров при фотографировании окрашенных препаратов

Окраски	Светофильтры	Примечание
Черно-белые окраски (гематоксилиновые лаки, импрегнации серебром и осмием, судан черный, окраски на миелин по Кульчицкому, реакции с образованием черных и темно-коричневых гранул)	ЗС1, ЗС6	Можно снимать без светофильтров. При наличии желтоватых и коричневых оттенков могут применяться ОС11, ЖС18
Окраски с преобладанием желтых и оранжевых тонов (судан III, шарлах, некоторые варианты реакции тетразониевого сочетания и др.)	СС2, СС5, ЗС1	При выраженном красном оттенке можно использовать СЗС8
Многоцветные окраски с сине-фиолетовыми и красными тонами (гематоксилин-эозин, варианты окраски по Романовскому, азановый метод, трехцветный метод Маллори)	ЗС1, ЗС7, ЖС18, ЗС3, ЗС6	При окраске по Маллори и необходимости выделить желтоватые тона используют СС2
Многоцветные окраски с наличием зелено-голубых и ярко-красных тонов (метиловый зеленый пиронин, карболовый фуксин по Цилю, ШИК-реакция с докраской ядер синькой, окраска риккетсий по Макиавелло	ЗС6, ЗС3, СС2	При резком преобладании красных структур можно использовать ОС11
Однотоновые окраски с преобладанием красноватых тонов (реакция Фельгена, галлоцианин, сафранин, везувин)	ЗС1, ЗС6	
Однотоновые окраски с преобладанием голубых и светло-синих тонов (метиленовый синий, берлинская лазурь, бромфеноловый синий, слабо выраженная окраска толуидиновым синим и тионином)	ОС11, ОС13, ЖС18	При необходимости выделить метахроматический красноватый оттенок — фильтры ЗС1, ЗС6

ортохроматические. Панхроматические форматные материалы рекомендуются для съемок препаратов со структурами красного цвета, особенно если в этих структурах имеются какие-либо детали. При работе с 35-мм пленками предпочтительней мелкозернистые пленки, например Изопанхром 18, КН-1, МЗ-2. Цветное микрофотографирование окрашенных препаратов целесообразно производить на негативные пленки ЛН-6, ЛН-5 либо на позитивные пленки.

2. Фотографирование неокрашенных препаратов

Так как структуры большинства неокрашенных препаратов практически неразличимы в видимом свете, то для получения их контрастного изображения применяют методы темного поля, фазового и интерференционного контраста. При фотографировании препаратов с помощью этих методов, как правило, нет надобности прибегать к контрастирующим светофильтрам.

Метод темного поля дает возможность выявить контуры объектов и границы структур, если они отличаются по показателю преломления друг от друга или от окружающей среды. Эффект темного поля иллюстрирован на рис. 116*, *г*, 129* *д* и 149*. Из-за малой освещенности изображения фотографирование при этом методе следует производить на материалах средней и высокой чувствительности (например, пленках Изопанхром 18, Изопанхром 17, А-2) и с источниками света высокой яркости.

Фазовоконтрастный метод позволяет видеть не только границы, но и внутреннюю структуру объектов, в этом можно убедиться по рис. 116*, *б*. Так как фазовые кольца в объективах рассчитаны на работу в среднем участке видимой области спектра, то оптимальное изображение получается при использовании зеленого светофильтра, например ЗС10, ЗС8 и ЗС1. Для съемки фазовоконтрастных изображений применяются мелкозернистые пленки Изопанхром 18, КН-1, Фото 35, МЗ-2 и др. Можно также работать с форматными материалами, такими, как пластинки Микрофотографические, Репродукционные, Изоортохроматические.

Метод интерференционного контраста в отличие от предыдущего метода дает цветные изображения прозрачных препаратов. Естественно, цветные микрофотографии в этом случае несут бо́льшую информацию, чем черно-белые. Для их получения целесообразно применять негативные пленки ЛН-7, ЛН-6 и ЛН-5 и позитивные пленки.

В черно-белой фотографии (рис. 116*, *в*) рекомендуются те же материалы, что и для метода фазового контраста. Съемку на черно-белые материалы для повышения качества изображения полезно вести в монохроматическом свете.

На рис. 154*, *а* приведена фотография крыла стрекозы с интерференционными полосами. Для того чтобы получить узкие интерференционные полосы на черно-белом фотоматериале (рис. 154,* *б*), следует при экспонировании использовать интерференционный светофильтр.

3. Фотографирование в ультрафиолетовых лучах

Ультрафиолетовая микроскопия позволяет изучать структуры биологических препаратов, не подвергая их химической обработке и окрашиванию, т. е. и в живом состоянии. Эта возможность обусловлена тем,

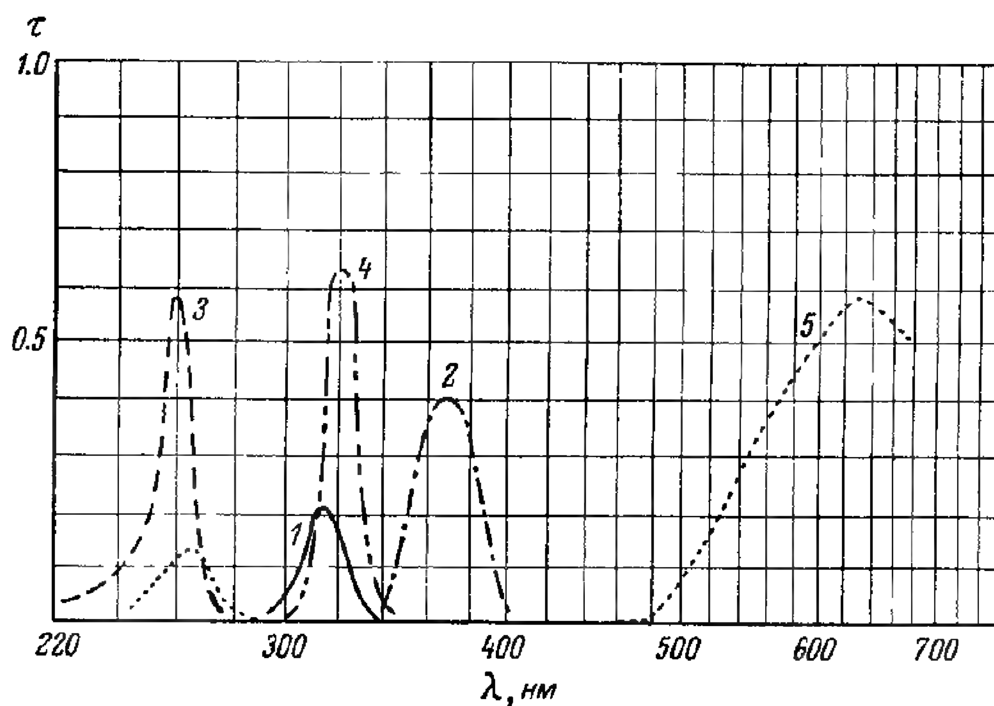


Рис. 155. Спектральные характеристики некоторых светофильтров для работы в ультрафиолетовой области спектра.

1 — стеклянный для λ=313 нм; *2* — стеклянный для λ=365 нм; *3*, *4* — интерференционные; *5* — газовый.

что некоторые важные химические вещества, составляющие эти объекты (нуклеиновые кислоты, белки, лигнин, ряд витаминов и гормонов), прозрачные в видимом свете, имеют характерные полосы поглощения в УФ области спектра.

Для фотографирования в узких спектральных диапазонах в УФ области могут применяться светофильтры или монохроматоры. Выделение ртутных линий производят стеклянными светофильтрами из специального на-

ТАБЛИЦА 20

Комбинации цветных стекол для выделения линий ртутного спектра (в скобках указана толщина стекла или $\lambda_{пр}$, в нм)

Длина волны, нм	Цветные стекла		
	I комплект	II комплект	III комплект
313	ЖС3 (4)+УФС2 (2)	ЖС3 (2)+УФС (2)	ЖС3 (1.2)+УФС2 (8)
365	БС7 (1.2)+УФС6 (3)	БС6 (2)+УФС 6 (2.5)	БС5 (2)+УФС6 (2)
405	ЖС10 ($\lambda_{пр}$=390)+ПС13 (4.5)	ЖС10 ($\lambda_{пр}$=390)+ПС13 (3.2)	ЖС10 ($\lambda_{пр}$=390)+ПС13 (2.3)
436	ЖС12 ($\lambda_{пр}$=435)+СС15 (2.0)	ЖС11 ($\lambda_{пр}$=420)+СС15 (1.5)	ЖС11 ($\lambda_{пр}$=420)+СС15 (1.2)
546	ОС11 ($\lambda_{пр}$=535)+ПС7 (5)+СЗС21 (5)	ЖС18 ($\lambda_{пр}$=510)+ПС7 (5)+СЗС21 (2)	ЖС18 ($\lambda_{пр}$=510)+ПС7 (5)
578	ОС13 ($\lambda_{пр}$=565)+ЗС7 (3)	ОС13 ($\lambda_{пр}$=565)+ЗС7 (1)	ОС13 ($\lambda_{пр}$=565)

бора, выпускаемого отечественной промышленностью. В наборе имеется три комплекта светофильтров, отличающихся шириной пропускаемого участка длин волн и оптической плотностью. На рис. 155 приведены кривые пропускания двух светофильтров из этого набора. Соответствующие светофильтры можно составить из цветного стекла (табл. 20). Для выделения спектрального диапазона 250—280 нм применяется газовый светофильтр, представляющий собой кварцевую кювету, заполненную газообразными хлором и бромом (рис. 155). В видимой области он пропускает свет с длинами волн больше 530 нм, который можно задержать светофильтром УФС1. В последнее время для выделения узких спектральных участков стали применяться интерференционные светофильтры (рис. 155).

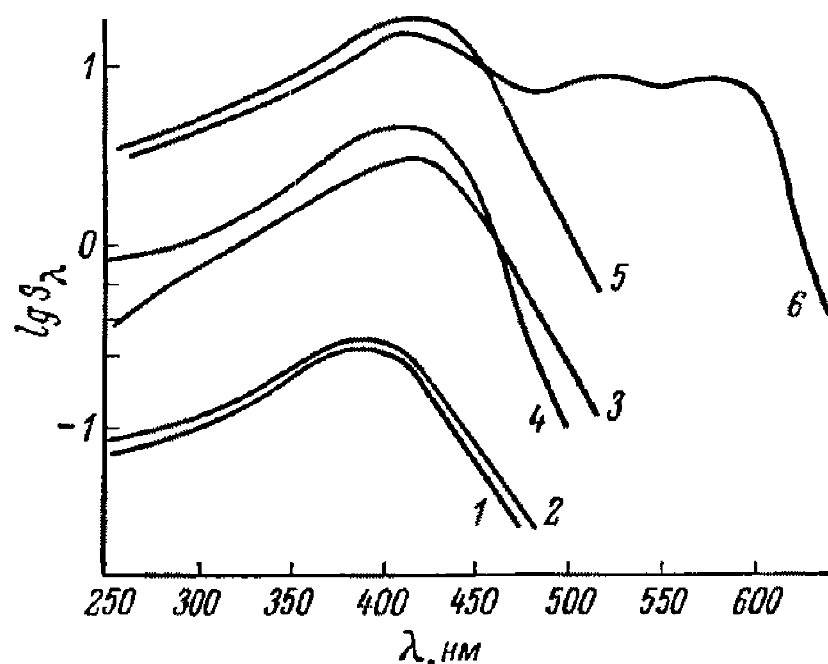


Рис. 157. Спектральные характеристики некоторых фотоматериалов.

1 — диапозитивные пластинки; *2* — кинопозитив МЗ; *3* — пластинки спектральные, тип 2; *4* — фонограммная пленка ЗТ-7; *5* — астрономическая пленка А-500; *6* — астрономическая пленка А-600.

Если в УФ микроскопе имеется монохроматор, то надобность в светофильтрах отпадает, хотя для фотографирования они иногда оказываются более предпочтительными.

Основная особенность микросъемки живых объектов обусловлена тем, что под действием коротковолнового УФ излучения они быстро изменяются и гибнут. Так, например, при действии на живые клетки коротковолновых УФ лучей из цитоплазмы в среду выходят нуклеотиды и даже РНК, изменяются размеры клеток, структура их оболочек и ядер (рис. 156*). Указанное обстоятельство заставляет ограничить время наблюдения препарата при фокусировке, выборе места и съемке. Еще лучше, если позволяет аппаратура, производить всю подготовку к съемке в видимом свете.

По указанным причинам для фотографирования в УФ лучах рекомендуется применять чувствительные фотоматериалы. Предпочтение следует отдавать несенсибилизированным материалам, так как они нечувствительны к тому длинноволновому участку спектра, который пропускается газовым светофильтром.

На рис. 157 приведены кривые спектральной чувствительности основных фотоматериалов, применяемых для УФ микроскопии. Так как контраст фотоматериалов в УФ области ниже, чем в видимой, то для работы следует выбирать высококонтрастные материалы. С учетом сказанного, лучшими материалами можно считать следующие: фонограммную пленку ЗТ-7, астрономическую пленку А-500, пленку Кинопозитив МЗ, диапозитивные пластинки, спектрографические пластинки, пластинки УФШ-3.

Метод цветовой трансформации

Метод был предложен Е. М. Брумбергом. Он заключается в следующем. Если отдельные структуры препарата различаются спектрами поглощения (отражения) или флуоресценции, то их изображение на фотографиях, снятых в различных длинах волн, соответствующих, например, максимумам поглощения или флуоресценции этих структур, будут отличаться плотностью. Обычно с помощью специальной трехпольной камеры делают снимки в трех длинах волн. Полученные три негатива (или диапозитива) помещают на столик специального прибора — хромоскопа, одновременно проектирующего три изображения на один экран. Освещение снимков производят раздельно, например, первый — через зеленый, второй — через красный, третий — через синий светофильтры. В результате возникает изображение в условных цветах, обусловленных различиями в спектральных характеристиках объекта. Для примера на рис. 158* приведены три черно-белых и цветная микрофотографии, полученные этим методом.

Интересно также отметить вариант метода цветовой трансформации — метод цветового сравнения. Он заключается в последовательном фотографировании одного и того же участка препарата до и после химического воздействия на этот препарат реактивами, вызывающими какие-либо химические или структурные изменения в этом препарате. Рассматривание на хромоскопе двух таких фотографий показывает, что в изображении станут окрашенными те структуры, в которых произошли изменения.

Оптическое совмещение фотографий на хромоскопе может быть использовано также для комбинирования изображений, полученных различными методами микроскопии, что дает в ряде случаев более наглядное представление о морфологическом строении и химическом составе объекта.

При фотографировании на хромоскопе рекомендуется применять цветную позитивную пленку либо негативные пленки ЛН-6, ЛН-5.

4. Фотографирование в свете видимой флуоресценции

Флуоресцентный метод получил широкое распространение, так как имеет высокую чувствительность и дает контрастные цветные изображения объектов. Так как большинство биологических объектов не обладает собственной флуоресценцией в видимой области спектра, то их предварительно окрашивают флуорохромами.

Выделение из излучения источника возбуждающего флуоресценцию света производится с помощью светофильтров УФС6, ФС1, СС4, характеристики которых приведены на рис. 159. Здесь же даны характеристики запирающих светофильтров ЖС3, ЖС18 и ЖС18+ЖЗС19.

Светофильтр, выделяющий возбуждающие излучения, и соответствующий запирающий светофильтр должны иметь высокую скрещенность. Практически скрещенность светофильтров проверяется следующим образом. Оба светофильтра помещают один за другим и экспонируют фотоматериал в течение времени, необходимого для съемки объекта. Если за это время на фотоматериале (после его проявления) получается едва

заметный фон, светофильтры можно считать хорошо скрещенными. Если фона совсем нет, плотность светофильтров можно ослабить.

Иногда при съемке препарата даже со скрещенными светофильтрами на негативе появляется некоторый фон. Он обусловлен флуоресценцией оптики микроскопа либо среды, в которую заключен объект.

Так как степень скрещенности зависит от выдержки, то в случае ярко флуоресцирующих объектов можно применять менее плотные светофильтры. Например, при фотографировании объектов, окрашенных флуорохромом акридиновым оранжевым, плотность светофильтров может быть меньше, чем при фотографировании слабо флуоресцирующих объектов, обработанных по методу Кунса.

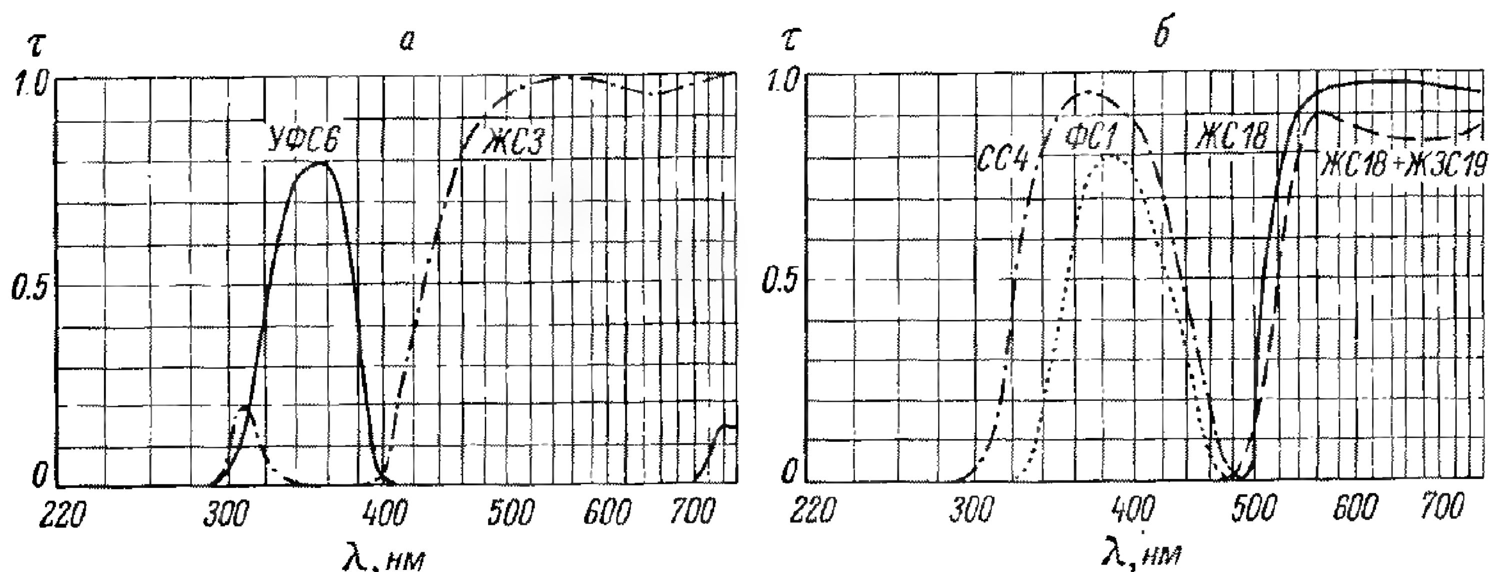


Рис. 159. Спектральные характеристики светофильтров для флуоресцентного метода.

а — для возбуждения светом с λ=365 нм; *б* — для возбуждения светом с λ=436 нм.

Полезно заметить, что запирающие светофильтры обладают собственной флуоресценцией, которая становится заметной на негативе при больших выдержках.

Если запирающий светофильтр состоит из двух стекол, одно из которых флуоресцирует, то последнее должно быть обращено к фотокамере. Так, светофильтр ЖС18+ЖЗС19 располагают так, чтобы стекло ЖЗС19 стояло первым по пути света. Во избежание повреждения светофильтра от перегрева его располагают после теплозащитного светофильтра.

Существенной трудностью, с которой постоянно сталкиваются исследователи при изучении биологических объектов в свете их флуоресценции, является быстрое угасание флуоресценции и изменение ее цвета. Это вызвано фотохимическим действием возбуждающего коротковолнового излучения. Следовательно, для фотографирования объектов в лучах их флуоресценции рекомендуется выбирать наиболее светочувствительные фотоматериалы. Их зернистость должна быть по возможности небольшой, так как негативы, снимаемые часто при малом масштабе изображения, требуется значительно увеличивать при последующей печати.

Из-за малой освещенности флуоресцентных изображений выдержки при съемке (например, на микроскопе МЛ-2 при полностью открытой апертурной диафрагме) составляют обычно 15—100 сек. Поэтому при выборе фотоматериалов следует принимать во внимание явление невзаимозаместимости.

Учитывая все сказанное, для микрофотографирования объектов в лучах их флуоресценции рекомендуются следующие фотоматериалы:

	Относительная чувствительность
Кинопленка А-2	1.7
Пленка РФ-3	1.7
Астрономическая пленка А-700	2
Панхром 10	1
Кинонегатив ВЧ	0.8
Фото 250	0.5
Изопанхром 17	0,4

За единицу чувствительности принята чувствительность пленки Панхром 10, причем все материалы сравнены путем съемки одного и того же эталонного объекта. Наилучшими по зернистости пленками из приведенных выше являются Изопанхром 17, А-2 и А-700.

Наибольшую информацию о флуоресцирующем препарате дает цветная микрофотография. Однако съемка на цветные материалы затруднена, так как последние имеют сравнительно невысокую чувствительность. Во флуоресцентной микроскопии рекомендуются негативные и обратимые цветные пленки дневного света ДС-5М, ЦО-32Д, а также ЦО—90Л.

Здесь можно сообщить о следующем приеме, который дает возможность получать цветную фотографию объекта в лучах его флуоресценции с выдержками, значительно меньшими, чем при обычной цветной съемке. Прием заключается в последовательной съемке флуоресцирующего объекта на два кадра высокочувствительной черно-белой пленки через два цветных светофильтра с последующим рассматриванием на хромоскопе, воспроизводящем цветное изображение объекта. Обычно для воспроизведения на хромоскопе цветных изображений можно ограничиться двумя черно-белыми снимками, каждый из которых снят в одном из трех основных цветов, так как спектр флуоресценции не распространяется на всю видимую область. Так, при фотографировании объектов, окрашенных акридиновым оранжевым, съемку ведут последовательно с зеленым и красным светофильтрами. Такие же светофильтры применяются и в хромоскопе.

При этом в свободный третий канал хромоскопа можно поместить снимок фазовоконтрастного изображения того же участка препарата. В этом случае в хромоскопе будут видны одновременно цветное фазовоконтрастное и флуоресцентное изображения препарата. Такой способ по своему эффекту подобен эффекту комбинированного освещения в обычной флуоресцентной микроскопии. Изложенный метод комбинирования особенно важен для исследований по методу Кунса.

На рис. 160* приведены черно-белые микрофотографии, снятые с помощью люминесцентного микроскопа, и цветная фотография, полученная при съемке в хромоскопе совмещенного изображения.

ТАБЛИЦА 21

Характеристики флуоресценции цветного стекла и плавленого кварца ($\lambda_{возб.}$=250—280 нм)

Марка стекла	$\lambda_{макс}$, нм	$I_{макс}$, относительных единиц	Полуширина, нм
УФС3	375	14.5	330—420
УФС4	375	80	340—410
БС3	390	170	350—480
БС4	400	2200	340—480
БС5	470	620	400—520
БС6	470	231	410—530
БС7	490	145	420—550
БС8	490	25	450—550
БС10	400	158	370—450
БС11	410	100	390—440
ЖС3	440	57	375—510
ЖС4	480	67	415—530
Кварц плавленый	365	15—20	350—390

5. Фотографирование в свете ультрафиолетовой флуоресценции

Метод УФ флуоресцентной микроскопии основан на том, что многие вещества, составляющие биологические объекты (ароматические аминокислоты, белки, липопротеиды, некоторые витамины, гормоны) флуоресцируют в УФ области спектра.

Для регистрации УФ флуоресценции при морфологических исследованиях применяют фотографирование обычно в области спектра 320—380 нм. Возбуждение УФ флуоресценции для большинства биологических объектов осуществляется большей частью излучением 240—290 нм.

Светофильтры для УФ флуоресцентной микроскопии, как и при обычном варианте флуоресцентной микроскопии, подбираются по максимальной скрещенности. Для возбуждения УФ флуоресценции применяют га-

зовый и интерференционные светофильтры, светофильтр, выделяющий линию ртутного спектра 313 нм (рис. 155), либо монохроматор.

Запирающими светофильтрами служат светофильтры стандартного набора для выделения линий ртутного спектра, интерференционные светофильтры, а также цветные стекла (в основном комбинации фильтров типа БС и УФС). Например, для фотографирования биологических объектов в лучах УФ флуоресценции часто применяют запирающий светофильтр, состоящий из стекол БС4 и УФС2, толщиной по 2 мм, пропускающий лучи длин волн 320—380 нм.

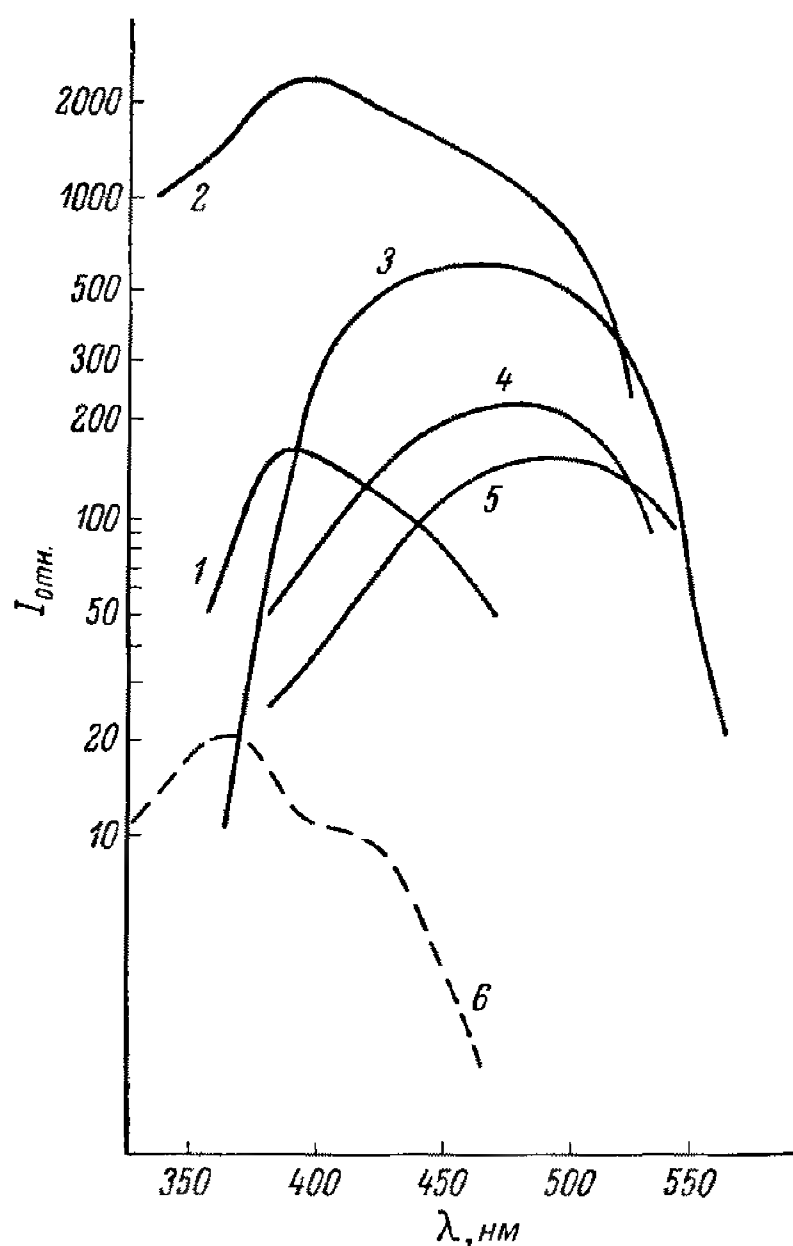


Рис. 161. Спектральные кривые флуоресценции некоторых оптических материалов.

1 — стекло БС3; 2 — БС4; 3 — БС5; 4 — БС6; 5 — БС7; 6 — плавленый кварц.

Следует отметить, что большинство цветных стекол, из которых состоят светофильтры для УФ флуоресцентной микроскопии, обладают довольно значительной собственной флуоресценцией, сильно снижающей в некоторых случаях контраст изображения (табл. 21). На рис. 161 приведены спектральные кривые флуоресценции некоторых цветных стекол, а также плавленого кварца при возбуждении флуоресценции излучением 250—280 нм. Так как спектральный состав флуоресценции плавленого кварца и флюорита близок к флуоресценции биологических объектов, то оптика микроскопа ухудшает в некоторой степени качество изображения.

При фотографировании по методу УФ флуоресцентной микроскопии, кроме снимка в лучах флуоресценции, с того же места препарата получают обычно снимок в проходящих УФ лучах, соответствующих максимуму поглощения объекта. Такая пара снимков дает бо́льшую информацию о морфологической структуре объекта и, кроме того, позволяет сопоставлять флуоресценцию отдельных структур с их поглощением. Пример таких снимков приведен на рис. 162*.

Особенно надо подчеркнуть, что интенсивность УФ флуоресценции биологических объектов чрезвычайно мала, поэтому при фотографировании следует выбирать наиболее чувствительные фотоматериалы. Так же как и в указанных выше случаях, здесь вследствие больших выдержек (20—50 сек.) на выбор фотоматериалов влияет явление невзаимозаместимости. Для метода УФ флуоресцентной микроскопии рекомендуются следующие материалы: астрономические пленки А-500 и А-600, пленка РФ-3, Кинонегатив А-2.

6. Прижизненное микрофотографирование

Для прижизненного фотографирования применяются методы фазового и интерференционного контраста, темнопольная, флуоресцентная микроскопия и др., о которых уже сообщалось ранее. Новым направлением в при-

жизненных исследованиях является контактная микроскопия. Ее основная особенность заключается в том, что специальный объектив микроскопа приводится в непосредственный контакт с поверхностью целого живого органа. Фронтальная линза объектива, слегка придавливая ткань, выравнивает рельеф и фиксирует ее положение. Благодаря выпуклой поверхности фронтальной линзы в микроскопе отсутствует кривизна изображения в пределах большого поля зрения, что очень существенно для микрофотографии.

Фокусировка микроскопа осуществляется либо перемещением окуляра вдоль его оптической оси, либо с помощью дополнительной оптической системы.

В настоящее время основным в контактной микроскопии является метод исследования в свете флуоресценции. Очевидно, что для фотографирования объектов в их прижизненном состоянии необходимы наиболее высокочувствительные фотоматериалы. Можно рекомендовать, например, пленки А-2, РФ-3, Изопанхром 17, А-700, Изопанхром 13.

Большое значение в прижизненном микрофотографировании имеют импульсные источники света, которые обеспечивают очень малые выдержки.

§ 2. МИКРОСЪЕМКА В МЕТАЛЛОГРАФИИ

Большинство металлографических исследований сопровождается микросъемкой поверхности изучаемых образцов. Основными задачами в металловедении являются исследование микроструктуры и фазовый анализ металлов и сплавов, т. е. определение состава, количества, распределения и строения присутствующих фаз.

Фазовый анализ выполняется, в частности, методами избирательного либо цветного (пленочного) травления. Последний дает возможность получать на фазах пленки различной окраски вследствие различия в химическом составе. Цвет пленки обусловлен избирательным поглощением или интерференцией света в пленке и позволяет по имеющимся таблицам и эталонным снимкам классифицировать фазы, не прибегая к разрушению образца. Отсюда ясно, что при методе пленочного травления особое значение приобретает цветное микрофотографирование. Съемку в этом случае целесообразно вести на пленки ЛН-6 и ЛН-5 или на позитивные пленки, дающие наибольший цветовой контраст. Так как полученные снимки сравниваются с эталонными, то следует возможно точнее выдерживать идентичность фотографирования и печати.

Если цвет пленки обусловлен только интерференцией, то он не характеризует химического состава пленки, а следовательно, и фазы. В ряде случаев пленки и фазы, невидимые в обычном микроскопе, различаются в ультрафиолетовой области спектра из-за специфического поглощения или отражения. Используя это свойство, можно с помощью метода цветовой трансформации (см. § 1) получать микрофотографии, на которых изображения фаз будут отличаться по цвету. Некоторые неметаллические включения обладают избирательным отражением в длинноволновой области спектра. Комбинируя на хромоскопе снимки одного и того же участка шлифа, полученные в УФ и длинноволновой областях спектра, можно получить дополнительную информацию об объекте.

Микрофотографирование по методу светлого поля выявляет структуру шлифа, если его отдельные элементы отличаются показателем отражения или спектральными характеристиками. В случае малого яркостного или цветового контраста изображения его можно увеличить путем соответствующего подбора фотоматериала и светофильтра (см. гл. V). Для более высокого качества снимка рекомендуется при работе со светофильтром применять его не только во время экспонирования, но и в процессе фокусировки.

В металлографии чаще всего применяют форматные материалы (например, пластинки Микрофотографические, Репродукционные изоортохроматические, Панхром).

Если на границах структур, не различимых в светлом поле, световые волны приобретают разность хода, то такие границы выявляются с помощью метода фазового контраста (рис. 128*). Фотографирование в этом случае рекомендуется выполнять, используя зеленый светофильтр. Границы структур хорошо заметны и в темном поле.

В отличие от фазового контраста интерференционная микроскопия позволяет получать цветные изображения малоконтрастных шлифов, причем изображения деталей структуры, находящихся на одном уровне, приобретают одинаковый цвет (рис. 163*). Таким образом, наглядно проявляется микрорельеф поверхности.

Так как на металлмикроскопах освещение объекта производится с помощью опак-иллюминатора через объектив (исключение составляет метод темного поля), то в оптической системе неизбежны большие потери световой энергии и снижение контраста изображения из-за значительного количества рассеянного света. Потери отчасти компенсируются применением ярких источников света.

Некоторые методики исследования требуют микрофотографий со стандартным масштабом изображения. Получить определенный масштаб с высокой точностью удается только на тех приборах, в которых имеется камера переменной длины. Объясняется это тем, что фактическое увеличение микроскопа, как правило, отличается на несколько процентов от номинального значения.

§ 3. МИКРОФОТОГРАФИРОВАНИЕ В ПОЛЯРИЗОВАННОМ СВЕТЕ

Фотографирование в поляризованном свете применяется при исследовании анизотропных объектов: минералов, руд, шлифов металлов, биологических препаратов и др. Благодаря поляризационному эффекту изображения многих препаратов становятся ярко окрашенными, поэтому наибольшую информацию об объекте передает цветная микрофотография (рис. 164*, *в*).

При съемке в проходящем свете на черно-белые материалы рудных и минералогических шлифов, как правило, не требуются контрастирующие светофильтры, потому что контраст изображений таких объектов достаточно высок. Светофильтр применяется только в случае необходимости подчеркнуть детали объекта одного цвета по отношению к другим (см. рис. 164*, *а* и б, а также гл. V).

Изображения рудных непрозрачных шлифов при исследовании в отраженном свете имеют преимущественно различные серые тона или слабую окраску отдельных элементов. Эти объекты целесообразно фотографировать со светофильтрами.

Ниже (на стр. 188) рассматриваются некоторые из таких задач.

Одной из особенностей рудных минералов и особенно углей является то, что они имеют низкий коэффициент отражения. Это приводит к малому контрасту изображения, так как поток, отраженный шлифом, соизмерим по величине с количеством света, рассеянного объективом. Фотография с обычным, даже иммерсионным объективом получается завуалированной (рис. 165*, *а*). Безрефлексный объектив с дополнительной пластинкой «четверть волны» значительно повышает контраст изображения (рис. 165*, *б*).

Применение поляризованного света при изучении поверхности металлов позволяет выявить природу и ориентацию кристаллических зерен в металле. В этом случае съемку производят обычно в скрещенных поляризаторах.

Контрастирующие светофильтры для некоторых рудных объектов

Увеличение контраста между объектами	Применяемый светофильтр
Халькоперитом и свинцовым блеском	Голубой (например, СС15)
Халькоперитом и пиритом	Тот же
Халькоперитом и медным блеском	Зеленый (например, ЗС11)
Халькоперитом и борнитом	Тот же
Медным блеском и ковелином	Голубой (например, СС15)
Спекуляритом и магнетитом	Тот же
Борнитом и ковелином	»
Аргентитом и свинцовым блеском	Зеленый (например, ЗС11)
Борнитом и тенантитом	Тот же
Сфалеритом и другими минералами	Желто-зеленый, желто-оранжевый (например, ЗС10, ОС11)
Жильными и другими минералами	Те же

Некоторые биологические объекты обладают анизотропными свойствами, хотя и в небольшой мере. Для примера можно указать на поперечно-полосатые мышечные, коллагеновые и нервные волокна, жир, хитин и др. Из-за малого двулучепреломления изображения таких объектов имеют серые тона первого порядка интерференции, поэтому их съемку можно проводить без контрастирующего светофильтра. Для увеличения двойного лучепреломления объекты иногда обрабатывают соответствующими красителями.

Значительного увеличения контраста изображения можно достигнуть с помощью компенсаторов, например пластинок «красная первого порядка» и «четверть волны». В этом случае, если необходимо, при фотографировании на черно-белые материалы применяют контрастирующие светофильтры.

Цветную съемку в поляризованном свете рекомендуют вести на пленки для дневного света. При выборе черно-белых материалов предпочтение следует отдавать мелкозернистым пленкам средней и высокой чувствительности. В случае малоконтрастных серых изображений биологических объектов нужны контрастные фотоматериалы. То же самое относится к съемке рудных образцов в отраженном свете. Однако эти рекомендации нельзя считать универсальными.

В поляризованном свете освещенности изображения часто бывают низкими, что объясняется физическими свойствами объекта и малым диаметром апертурной диафрагмы при ортоскопическом ходе лучей. Поэтому желательно иметь достаточно яркий источник излучения. Так как свет источника частично поляризован, то некоторый выигрыш в освещенности (до 20%) можно получить, если ориентировать витки спирали лампы и плоскость колебаний поляризатора в плоскости симметрии микроскопа.

При работе в поляризованном свете не на специализированных, а на обычных микроскопах следует обращать внимание на качество оптики. Она не должна иметь внутренних натяжений, являющихся причиной искусственного двулучепреломления. Оптика считается удовлетворительной, если при скрещенных поляризаторе и анализаторе в отсутствие объекта поле зрения будет достаточно темным.

Для фотографирования в поляризованном свете лучше всего пригодны микрофотонасадки с выключающейся светоделительной призмой, ибо последняя может внести изменения в структуру поляризованного света. Если же в распоряжении экспериментатора имеется только насадка со ста-

ционарной светоделительной призмой, то необходимо анализатор ориентировать так, чтобы его плоскость колебаний была перпендикулярна оптической оси визирной трубки.

Ввиду того что сильный нагрев поляризационного фильтра нежелателен, целесообразно в осветительной системе микроскопа устанавливать теплозащитный светофильтр.

Картина, возникающая в выходном зрачке объектива при коноскопировании, может иметь много интерференционных порядков. Если ее фотографируют не на цветную, а на черно-белую пленку, то для получения узких полос полезно использовать высококонтрастные материалы и интерференционные светофильтры.

§ 4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВИДЫ МИКРОФОТОГРАФИИ

Ниже рассматриваются некоторые специальные виды микросъемки, имеющие специфический характер.

Микросъемка в высокотемпературной металлографии — весьма важный метод исследований объектов в нагретом состоянии. Это и понятно: ведь чаще всего структура объектов или их форма изменяются в процессе опыта, а фотография позволяет сохранить их изображения. Особенности поведения объекта при высоких температурах накладывают определенные ограничения на его микросъемку. Во-первых, раскаленные объекты излучают свет; во-вторых, вещество объекта распыляется, если он находится в вакууме; в-третьих, структура препарата может претерпевать изменения, протекающие иногда с большой скоростью. Все это сказывается на тех или иных условиях фотографирования.

Излучение объекта имеет ярко выраженный красноватый оттенок и происходит практически равномерно со всей поверхности. В таком свете нельзя обнаружить какую-либо структуру. Поэтому в высокотемпературной металлографии применяют яркие источники света, богатые коротковолновым излучением (ртутные и ксеноновые дуговые лампы), в сочетании с интерференционными светофильтрами. На микрофотографии, полученной при этих условиях (рис. 166*), можно видеть, что структура объекта достаточно хорошо выявляется. Распыление вещества объекта приводит к довольно быстрому потемнению смотрового окна нагревательной камеры, что снижает освещенность изображения. Следовательно, фотографирование должно проводиться возможно быстрее.

Структурные превращения в объекте, как и любой другой процесс, определяют максимальную выдержку. Нельзя допускать, чтобы за время экспонирования размеры изображений элементов структуры изменялись больше, чем на величину, характеризуемую остротой зрения, т. е. на 0.15 мм. В противном случае изображение станет нерезким. Если же принять во внимание, что изменение размеров влечет за собой уменьшение глубины резкого изображения и разрешающей способности прибора, то указанная величина должна быть еще меньше.

Фотография в инфракрасной микроскопии — один из основных способов превращения невидимого изображения в видимое. Поэтому ей придается особое значение. К сожалению, ассортимент негативных фотографических материалов, чувствительных к инфракрасному излучению, очень мал, а чувствительность материалов невелика. Отсюда следует, что источник излучения должен иметь высокую яркость. Если яркость лампы накаливания недостаточна, то рекомендуют пользоваться ксеноновой лампой сверхвысокого давления с интенсивным инфракрасным излучением.

Фокусировка микроскопа на резкое изображение осуществляется с помощью электронно-оптического преобразователя, превращающего невидимое изображение в видимое. Из-за аберраций электронно-оптической системы качество изображения на экране преобразователя хуже, чем в обычном микроскопе. Поэтому фотография лучше передает изображение объекта во всех его тонкостях. На снимке (рис. 167*, *а*), полученном в инфракрасных лучах, видны зоны кристаллизации в бескислородном сульфидно-селенидном стекле, которое совершенно непрозрачно для видимого света. Аналогичным образом фотографирование в инфракрасных лучах позволяет выявить полисинтетические двойники в бурноните (рис. 167*, *б*).

Микрофотографирование в ядерной физике применяется при исследовании толстослойных фотоэмульсий со следами элементарных частиц главным образом для получения иллюстративного материала.

Следы частиц, представляющие собой цепочки черных зерен, имеют различные направления в пространстве (рис. 168*). Поэтому в общем случае след не виден одновременно резким по всему полю зрения. Для того чтобы сфотографировать след большей длины, рекомендуется произвести последовательную съемку на один кадр нескольких слоев препарата, перефокусировывая микроскоп. Некоторое уменьшение контраста при этом неизбежно.

Микрофотография в технике играет обычно вспомогательную роль, если не считать особых случаев ее применения. При изучении технических объектов часто производят съемку их теневого изображения или съемку в темном поле. Пример последней показан на рис. 169*. Такое изображение дает возможность удобно сличать конфигурацию деталей предмета с тест-объектом.

Съемка с экрана телевизионного микроскопа требует либо выдержки, продолжающейся в течение развертки не менее десяти кадров, либо синхронизации фотокамеры с разверткой телевизионного растра, иначе негатив будет иметь неодинаковую плотность по кадру. Применять контрастирующие светофильтры для съемок в телевизионной микроскопии не нужно, так как контраст изображения можно менять с помощью электронной системы.

Микрофотография в криминалистике служит не только для документирования вещественных доказательств, но также является важным методом обнаружения доказательств при экспертизе. Довольно часто в криминалистике встречается метод сравнительного фотографирования, когда исследуемый объект фотографируется вместе с эталонным одновременно на один кадр. Это достигается с помощью микроскопа сравнения, в котором объекты помещаются на разные предметные столики и с помощью двух оптических систем проектируются в поле зрения одного окуляра. Очевидно, что в этом случае необходимо следить за тем, чтобы освещенности обоих объектов были одинаковы.

Спецификой некоторых криминалистических объектов является их сравнительно большая протяженность по глубине, что влечет за собой необходимость фотографирования с большой глубиной резкого изображения. Увеличить глубину резкости можно с помощью дополнительно изготовленных апертурных диафрагм, устанавливаемых вблизи зрачка микроскопа или его изображения.

При съемке в криминалистике бывает необходимо особенно подчеркнуть границы некоторых деталей. В черно-белой фотографии это осуществляется применением контрастирующих светофильтров и соответствующих фотоматериалов. В цветной фотографии для повышения контраста изображения и улучшения цветопередачи применяют метод маскирования, который заключается в следующем. С одного и того же объекта последова-

тельно получают два негатива — черно-белый (с контрастирующим светофильтром) и цветной. Печать на цветную бумагу производят, совместив оба негатива. Для получения цветных фотографий с повышенным контрастом применяют также метод цветовой трансформации (см. § 1).

Используя свойства ряда объектов (например, писчей бумаги, графита, растворов чернил) избирательно поглощать или отражать излучение в невидимой области спектра, удается с помощью фотографии получать при экспертизе дополнительные сведения. Например, можно обнаружить следы травления текстов, установить различия в материалах, применяемых для изготовления документов, установить сорт бумаги или чернил, выявить какие-либо пятна или отпечатки и т. д.

В случае исследования вещественных доказательств, в состав которых входят флуоресцирующие компоненты, значительную помощь оказывает флуоресцентная микроскопия.

§ 5. ИМПУЛЬСНАЯ МИКРОФОТОГРАФИЯ

Время экспонирования при фотографировании с импульсными источниками света составляет 10^{-3}—10^{-6} сек. Поэтому импульсная микрофотография оказывает неоценимую услугу при съемке объектов, в которых совершаются какие либо быстротекущие процессы, а также живых биологических объектов. Обычное фотографирование живых объектов в УФ области спектра или свете флуоресценции сопровождается быстрым изменением их

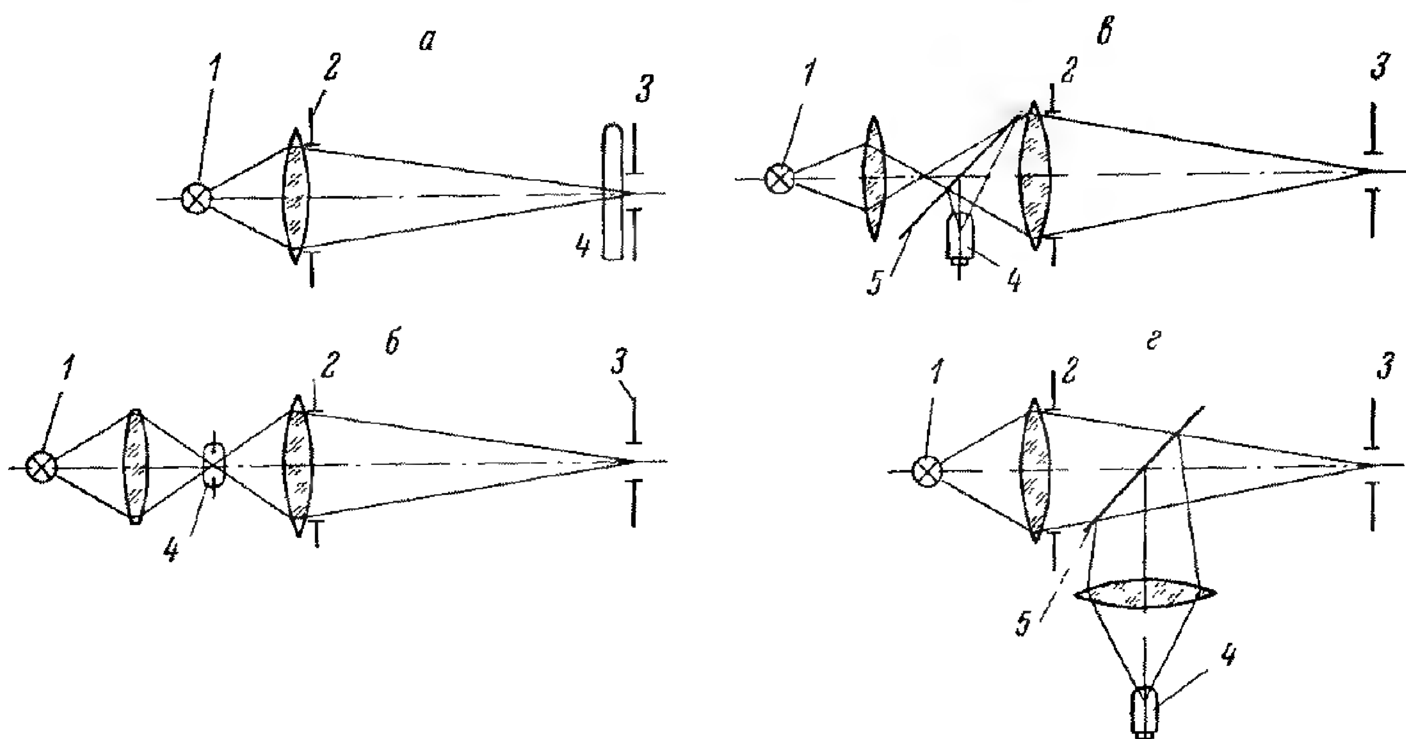


Рис. 170. Схемы осветительной системы с импульсной лампой и лампой накаливания.

1 — лампа накаливания; *2* — полевая диафрагма; *3* — апертурная диафрагма; *4* — импульсная лампа; *5* — светоделительная пластинка.

свойств и гибелью из-за фотохимических процессов. Последние могут происходить и в фиксированных препаратах.

Для экспонирования необходима определенная доза облучения объекта. Если она получена с источником высокой яркости за очень короткий промежуток времени, то в процессе экспонирования в препарате не успевают произойти какие-либо изменения. Короткие выдержки бывают полезны и в некоторых других случаях, например, когда при съемке не удается устранить влияние вибраций.

К импульсным лампам, применяемым для микрофотографирования, предъявляются следующие требования: 1) яркость должна быть высокой; 2) размеры светящегося тела могут не превышать 3—5 мм, что влечет за собой небольшую мощность лампы; 3) форма светящегося тела должна быть такой, чтобы его изображение полностью

ТАБЛИЦА 22

Характеристики некоторых импульсных ламп

Тип лампы	Форма светящейся части	Размер светящейся части, мм	Длительность вспышки, мксек.	Интервал между вспышками, сек.	Амплитудная яркость, Гнт	Энергия вспышки, дж	Напряжение зажигания, в	Рабочее напряжение, в	Емкость питающего конденсатора, мкф	Средняя мощность лампы, вт	Срок службы, тыс. вспышек	Баллон
ИСШ-500	Прямая	∅5×8	0.025	15	100	160	5000	7000	6.5	10	360	Кварцевый
ИСШ-100-1	Шар	∅0.7×3	0.0013	0.002	100	0.22	800	3000	0.05	100	300	Из увиолевого стекла
ИФТ-200	Диск	∅6	10	15	0.7	40	240	200	3000	3	5	То же
ИФК-120	U-образная	5×23×30	1	10	0.7	120	140	300	2500	12	10	Стеклянный
ИФБ-300	Кольцо	∅8×85	8	7.5	0.05	300	2000	300	6500	40	10	То же
ИСК-25	U-образная	5×21×20	6	20	2	600	250	300	1300	30	10	Кварцевый

вписывалось в апертурную диафрагму; 4) интервал между вспышками полезно иметь небольшим; 5) распределение энергии излучения в спектре лампы должно соответствовать той области спектра, в которой производится фотографирование; 6) с точки зрения техники безопасности целесообразно иметь лампу с небольшим рабочим напряжением. Характеристики некоторых пригодных для микрофотографии импульсных ламп приведены в табл. 22.

Больше всего для микрофотографии подходят лампы ИФТ-200 и ИСШ-500 благодаря хорошим светоэнергетическим и спектральным параметрам. С этими лампами за время одной вспышки можно получать фотографии живых клеток в проходящих УФ лучах или свете флуоресценции.

Импульсная лампа не позволяет производить наблюдение объекта. Поэтому в приборе, кроме нее, должна иметься и лампа накаливания. Возможны различные сочетания обеих ламп в осветительной системе микроскопа (рис. 170). В случае *а*, когда импульсная лампа помещается вблизи апертурной диафрагмы конденсора, ее светящееся тело должно иметь большие размеры. Можно получить промежуточное изображение лампы накаливания и поместить в этой плоскости импульсную лампу (случай *б*). Недостатком этих схем является необходимость применять освещение через колбу импульсной лампы, а также невозможность применения торцовых ламп. В случаях *в* и *г* изображения обеих ламп проектируются в плоскость апертурной диафрагмы соответствующей линзой, а совмещение световых пучков в одном тракте производится светоделительной пластинкой. Схема рис. 170, *г* использована, например, в микроскопе МБИ-15. Возможен также вариант, когда обе лампы монтируют на подвижных салазках и по мере надобности устанавливают в оптическую систему любую из них.

Для освещения непрозрачных объектов падающим светом иногда применяют кольцевую импульсную лампу, монтируемую вокруг объектива. Это дает возможность в стереомикроскопии и макрофотографии обеспечить бестеневое освещение объекта.

Экспозиция при импульсной фотографии определяется интегралом яркости по времени, т. е. произведением амплитудной

яркости на длительность вспышки лампы. Если в приборе предусмотрены недостаточные диапазоны изменения интеграла яркости, то регулировка освещенности изображения для получения оптимального почернения негатива осуществляется с помощью нейтральных светофильтров.

Светочувствительность фотоматериала должна соответствовать уровню освещенности изображения. Наибольшей светочувствительностью при сверхкоротких выдержках обладают пленки ВЧ, Панхром 10, Изопанхром 13, Изопанхром 17. При цветной съемке наилучшие результаты получают на пленках дневного света, так как цветовая температура импульсных ламп составляет около 6000° К.

§ 6. ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОФОТОГРАФИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Количественные методы фотометрирования объектов под микроскопом подразделяются на фотоэлектрический и фотографический. Последний заключается в том, что объект фотографируется через микроскоп, а затем полученный снимок фотометрируется на стандартном микрофотометре (типа МФ-2 или МФ-4). Фотографический метод, существенно уступая фотоэлектрическому в точности и длительности процесса измерений, имеет следующие преимущества: 1) результаты измерений могут быть сопоставлены с топографией структур объекта; 2) в случае необходимости измерения можно повторить в любое время, если сохранился негатив; 3) измерению доступны любые участки изображения в пределах разрешающей способности микроскопа; 4) работа может быть выполнена на простой аппаратуре, состоящей из обычного микроскопа и устройства для фотографирования.

На первой стадии исследования объекта его фотографируют в выбранном спектральном диапазоне. Съемку целесообразно выполнять с учетом рекомендаций, изложенных в гл. V. Надо обратить особое внимание на то, что негативы, предназначенные для количественных исследований, нельзя подвергать усилению и ослаблению, которые искажают результаты измерений.

Вторая стадия состоит в фотометрировании полученного негатива и обработке результатов измерения. Для определения плотности в данной точке объекта необходимо знать коэффициент контрастности фотоматериала, а также плотности почернения изображения измеряемого участка и окружающей среды. Коэффициент контрастности можно найти, если сфотографировать фотометрический клин (ступенчатый ослабитель), помещенный в плоскости изображения объекта (или сопряженной с ней). Плотность объекта подсчитывается по формуле

$$D = \lg \frac{H_ф}{H_0} = \lg H_ф - \lg H_0 = \frac{D_ф - D_0}{\gamma},$$

где $H_ф$ и H_0 — количества освещения, падающие на участки фотоматериала, соответствующие изображению фона и объекта; $D_ф$ и D_0 — плотности почернения изображения фона и объекта на негативе; γ — коэффициент контрастности фотоматериала. Последний вычисляется по формуле

$$\gamma = \frac{D_{кл} - D'_{кл}}{\lg H_{кл} - \lg H'_{кл}},$$

где $D_{кл}$ и $D'_{кл}$ — соответственно измеренные плотности почернения (находящиеся на прямолинейном участке характеристической кривой) двух ступенек фотометрического клина; $\lg H_{кл}$ и $\lg H'_{кл}$ — паспортные оптические плотности соответствующих ступенек. Выдержка при фотографировании

ступенчатого ослабителя должна быть такой, чтобы ступенька с $\lg H=1$ передавалась на негативе плотностью, не на много отличающейся от 1.

Расположение плотностей почернения изображений фона и объекта в пределах прямолинейного участка характеристической кривой достигается экспериментальным подбором выдержек при фотографировании данного препарата. Если же указанные плотности выходят за пределы прямолинейного участка, то для правильных измерений необходимо построить всю характеристическую кривую, по которой находят величины $\lg H_ф$ и $\lg H_0$. Условия съемки и проявления негативов объекта и клина должны быть идентичными.

Естественно, что наилучшие результаты достигаются при одновременном фотографировании на один кадр объекта и ослабителя (как это осуществлено, например, в микроскопе МУФ-6). Если конструкция прибора не позволяет это сделать, то их съемку производят последовательно, но тогда необходимо поддерживать стабильными световой поток и выдержку.

Очевидно, что точность измерений при фотографическом методе фотометрии зависит от равномерности освещения поля зрения. Следовательно юстировка осветительной системы должна быть выполнена как можно тщательней. Однако следует учитывать, что даже при самой хорошей настройке имеет место некоторая неравномерность освещения, и в случае необходимости вносить в результаты измерений соответствующие поправки.

В заключение можно указать на метод микрофотометрии с применением фотографирования на цветные пленки. После фотографирования объекта из пленки вырезают одинаковые по площади участки с изображениями измеряемых структур и фона. Затем из этих кусочков пленки извлекаются красители и по их количеству судят о плотности структур объекта, соответствующих данному месту изображения.

Глава VII

МАКРОФОТОГРАФИЯ

Макрофотографией, или лупной съемкой, называют съемку с увеличениями от 1 до 20—30×. Производится она с помощью объективов, специально рассчитанных для этой цели. Объективы характеризуются фокусным расстоянием f' и величиной *относительного отверстия* (отношением диаметра действующей диафрагмы к фокусному расстоянию). Последняя величина для удобства выражается в виде дроби $^1/_z$, где z — так называемое *диафрагменное число*. Наиболее распространены объективы с фокусным расстоянием от 40 до 150 мм и диафрагменными числами от 3.5 до 32. Относительное отверстие объективов изменяется с помощью встроенной в них ирисовой диафрагмы.

Макрофотографирование можно производить на установке ФМН-2, где изображение освещенного объекта проектируется на фотопластинку.

Простейшая самодельная установка должна состоять из осветителей или софитов, камеры постоянной или переменной длины и любительского фотообъектива. Следует заметить только, что для улучшения качества изображения объектив должен быть обращен лицевой стороной к пластинке. Такую установку можно легко переоборудовать, например, из обычного фотоувеличителя, предназначенного для печати с пластинок.

Часто съемку с небольшими увеличениями производят с помощью любительской малоформатной пленочной фотокамеры. Между объективом и камерой вводят специальное переходное кольцо, благодаря чему расстояние от объектива до пленки увеличивается. Однако полезно знать, что чем дальше отодвинут объектив, тем больше отличается ход лучей в нем от расчетного, из-за чего ухудшается качество изображения. Иногда вместо переходного кольца рекомендуют применять насадные линзы, монтируемые на объективе. Случайные линзы для этих целей не годятся, потому что они могут ухудшить качество изображения. Камеру для съемки закрепляют вблизи объекта на каком-либо штативе. Рациональней и проще пользоваться для лупной съемки зеркальной камерой, так как ее конструкция обеспечивает более высокую точность фокусировки, нежели камера с дальномером.

Однако как кольца, так и насадочные линзы дают возможность производить съемку только с уменьшением. Для фотографирования как с небольшим уменьшением, так и с увеличением можно рекомендовать следующий способ. Перед объективом зеркальной камеры устанавливается второй объектив так, что оба объектива обращены друг к другу передними линзами. В этом случае увеличение при съемке определяется делением фокусного расстояния первого объектива на фокусное расстояние второго. Для соединения объективов друг с другом следует изготовить специальную резьбовую втулку, которая ввертывается в объективы вместо светофильтров

Основные параметры, имеющие значение при макросъемке, с достаточной степенью точности определяются следующими выражениями, которые легко получить из формул глав I и II:

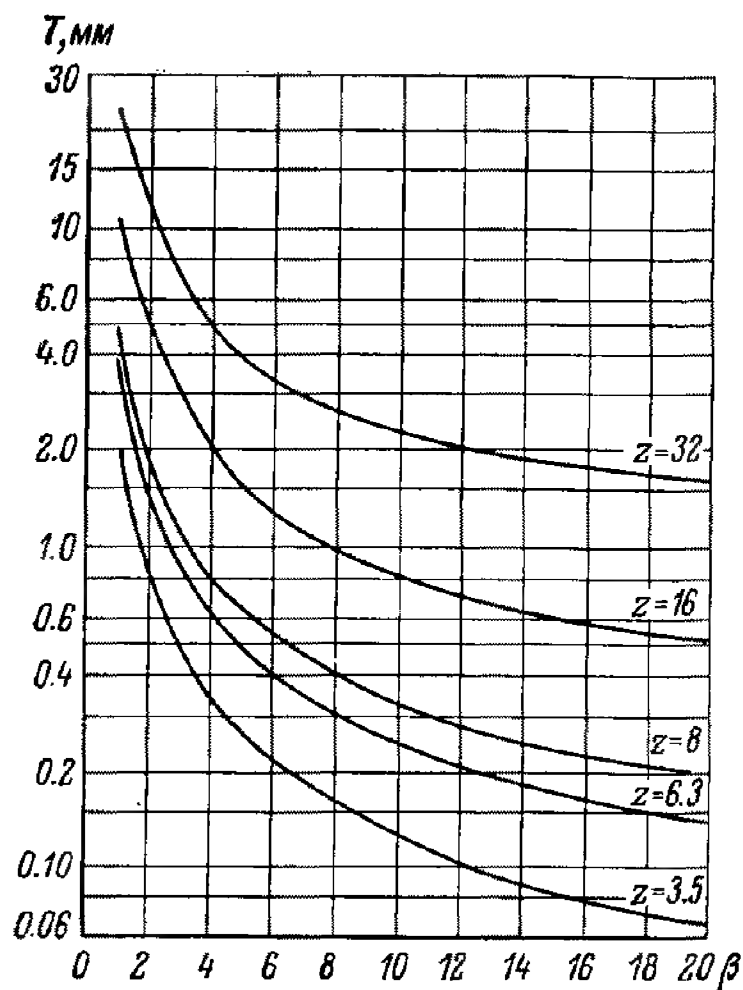


Рис. 171. Зависимость глубины резкости от масштаба изображения.

масштаб изображения $\beta = \frac{K}{f'}$,

глубина резкого изображения

$$T = \frac{2z(\beta+1)}{7\beta^2}[1 + 7z\lambda(\beta+1)],$$

освещенность

$$E = \frac{\tau\pi B}{4z^2(\beta+1)^2},$$

где K — длина камеры; τ — коэффициент пропускания оптической системы; B — яркость источника света; λ — длина волны света, выраженная в миллиметрах.

Масштаб изображения является определяющим параметром при макрофотографировании. При данном объективе он зависит только от расстояния между объективом и пластинкой. Кстати, макросъемку целесообразно производить с помощью пластиночных камер, чтобы иметь достаточно большое поле зрения.

Выбор масштаба изображения зависит как от величины объекта, так и от размеров его деталей. Желательно, чтобы в кадр вписывалось изображение если не всего объекта, то какой-то композиционно целой его части. При этом, естественно, изображения отдельных элементов должны быть такого размера, какой требуется для их рассматривания глазом без особого напряжения. Для измерения масштаба изображения пользуются способом, описанным в гл. V, только вместо объект-микрометра применяют линейку с миллиметровой шкалой.

Глубина резкого изображения в макросъемке играет немаловажную роль, так как здесь фотографируются объекты, имеющие обычно сравнительно большую протяженность по глубине. На рис. 171 приведена зависимость глубины резкого изображения от масштаба изображения для различных диафрагменных чисел.

При малых увеличениях и малых относительных отверстиях, когда глубина резкости составляет всего несколько миллиметров, ее величину можно легко определить следующим образом. Установив в качестве объекта миллиметровую линейку под углом 45° к оптической оси прибора, надо по изображению на матовом стекле подсчитать, сколько интервалов шкалы видны резкими. Деление полученного числа на 1.4 дает величину глубины резкости.

Фотография, сделанная при малой глубине изображения, плохо передает объемность предмета (рис. 172*, справа), тогда как большая глубина явно способствует хорошему впечатлению от снимка (рис. 172*, слева). Однако в некоторых случаях глубину специально уменьшают, чтобы избавиться от присутствия на фотографии изображений каких-либо нежелательных элементов.

Фокусировать объект перед съемкой следует при полностью открытой диафрагме, а затем уменьшить ее диаметр до того размера, который обеспечит требуемую глубину резкого изображения.

Выбранные масштаб изображения и глубина резкости определят и уровень освещенности в плоскости пластинки, причем освещенность убывает с увеличением масштаба и диафрагменного числа. Повысить освещенность можно только путем применения источника света с большей яркостью.

Выбор светофильтров и фотоматериалов в макросъемке подобен описанному в предыдущих главах.

Ценность фотографии (т. е. ее качество, достоверность, желаемый эффект, полезность), полученной при макросъемке, во многом определяется условиями освещения объекта. Поэтому им уделяется особое внимание. Подбирая соответствующее освещение, можно выявить рельеф поверхности, сгладить или, наоборот, подчеркнуть какие-нибудь детали в объекте и т. д.

Если объект имеет неглубокий рельеф с плавными переходами и сравнительно крупными деталями, то его одностороннее освещение под большим углом падения дает возможность подчеркнуть рельефность благодаря образованию глубоких теней. Эффект такого освещения можно видеть на рис. 173*. Но этот способ малопригоден для объектов с глубоким профилем, так как сильные контрастные тени высоких участков прикроют сравнительно низкие участки и не позволят их обнаружить. В объектах с мелкими, близко расположенными деталями глубокие тени тоже нежелательны, потому что они затрудняют зрительное восприятие (рис. 174*, *а*). В таких случаях полезно осветить объект равномерно со всех сторон или применить несколько расположенных по кругу осветителей, сделав один из них более ярким. Тогда на объекте образуются более мягкие тени (рис. 174*, *б*).

Бывает так, что на поверхности объекта при его освещении возникает много бликов, которые явно нежелательны. Иногда их удается погасить, наклоняя объект или изменяя положение осветителей. Если это не помогает, надо искать иные пути. Например, от бликов на отдельных участках внутренней полости лягушки можно избавиться, если поместить лягушку под воду (рис. 175*).

С прозрачными биологическими препаратами или шлифами минералов дело обстоит проще: их, как правило, освещают равномерно проходящим светом (рис. 176*). В этих случаях желательна настройка освещения по способу Кёлера.

Соотношение коэффициентов пропускания и оптической плотности

τ, %	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
0		3.00	2.70	2.52	2.40	2.30	2.22	2.15	2.10	2.05
1	2.00	1.96	1.92	1.89	1.85	1.82	1.80	1.77	1.74	1.72
2	1.70	1.68	1.66	1.64	1.62	1.60	1.59	1.57	1.55	1.54
3	1.52	1.51	1.50	1.48	1.47	1.46	1.44	1.43	1.42	1.41
4	1.40	1.39	1.38	1.37	1.36	1.35	1.34	1.33	1.32	1.31
5	1.30	1.29	1.28	1.28	1.27	1.26	1.25	1.24	1.24	1.23
6	1.22	1.21	1.21	1.20	1.19	1.19	1.18	1.17	1.17	1.16
7	1.15	1.15	1.14	1.14	1.13	1.13	1.12	1.11	1.11	1.10
8	1.10	1.09	1.09	1.08	1.08	1.07	1.07	1.06	1.06	1.05
9	1.05	1.04	1.04	1.03	1.03	1.02	1.02	1.01	1.01	1.00
10	1.00	1.00	0.99	0.99	0.98	0.98	0.97	0.97	0.97	0.96
11	0.96	0.95	0.95	0.95	0.94	0.94	0.93	0.93	0.93	0.92
12	0.92	0.92	0.91	0.91	0.91	0.90	0.90	0.90	0.89	0.89
13	0.89	0.88	0.88	0.88	0.87	0.87	0.87	0.86	0.86	0.86
14	0.85	0.85	0.85	0.84	0.84	0.84	0.84	0.83	0.83	0.83
15	0.82	0.82	0.82	0.82	0.81	0.81	0.81	0.80	0.80	0.80
16	0.80	0.79	0.79	0.79	0.78	0.78	0.78	0.78	0.77	0.77
17	0.77	0.77	0.76	0.76	0.76	0.76	0.75	0.75	0.75	0.75
18	0.74	0.74	0.74	0.74	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.72
19	0.72	0.72	0.72	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71	0.70	0.70
20	0.70	0.70	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.68	0.68	0.68
21	0.68	0.68	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.66	0.66	0.66
22	0.66	0.66	0.65	0.65	0.65	0.65	0.65	0.64	0.64	0.64
23	0.64	0.64	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.62	0.62
24	0.62	0.62	0.62	0.61	0.61	0.61	0.61	0.61	0.60	0.60
25	0.60	0.60	0.60	0.60	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59	0.59
26	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.57	0.57	0.57	0.57
27	0.57	0.57	0.57	0.57	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
28	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54
29	0.54	0.54	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.52
30	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.51	0.51	0.51	0.51
31	0.51	0.51	0.51	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
32	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.48	0.48
33	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
34	0.47	0.47	0.47	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
35	0.46	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.44
36	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	0.43	0.43
37	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.43	0.42	0.42	0.42	0.42
38	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41
39	0.41	0.41	0.41	0.41	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
41	0.39	0.39	0.39	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
42	0.38	0.38	0.38	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
43	0.37	0.37	0.37	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36
44	0.36	0.36	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
45	0.35	0.35	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
46	0.34	0.34	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
47	0.33	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
48	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
49	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.30	0.30	0.30	0.30
50	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.29	0.29	0.29	0.29
51	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29	0.28
52	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
53	0.28	0.28	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
54	0.27	0.27	0.27	0.27	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26

τ, %	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
55	0.26	0.26	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
56	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.24
57	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
58	0.24	0.24	0.24	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23
59	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.22	0.22	0.22	0.22
60	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
61	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
62	0.21	0.21	0.21	0.21	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
63	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19
64	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
65	0.19	0.19	0.19	0.19	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
66	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17
67	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
68	0.17	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
69	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
70	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
71	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14
72	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
73	0.14	0.14	0.14	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
74	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
75	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
76	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11
77	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
78	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
79	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
80	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
81	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
82	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
83	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
84	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
85	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
86	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
87	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
88	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
89	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
90	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
91	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
92	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
93	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
94	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
95	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
96	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
97	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
98	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Возможные ошибки в микрофотографии и их устранение

Дефекты на негативе	Причина возникновения дефекта	Способы устранения	Примечание
Изображение нерезкое	1. Длина тубуса не соответствует номинальному значению.	Длину тубуса привести в соответствие с номинальным значением.	Подробней см. на стр. 60, 146
	2. Толщина покровного стекла не соответствует номинальному значению.	Сменить покровное стекло;	стр. 105
		ввести поправку с помощью коррекционной оправы объектива или изменением длины тубуса.	стр. 146
	3. Самопроизвольное перемещение механизма фокусировки или тубуса.	Исправить прибор; отрегулировать механизм; закрепить тубус.	стр. 148
	4. Не сопряжены плоскости фотоэмульсии и сетки визирной трубки.	Исправить прибор.	стр. 174
	5. Фокусировка и съемка производились с разными светофильтрами.	Повторить фокусировку и съемку с одним светофильтром.	стр. 186
	6. Внешние вибрации.	Амортизировать прибор;	стр. 174
		произвести съемку с импульсной лампой.	стр. 191
	7. Вибрации при неосторожном взводе затвора фотоаппарата.	Произвести повторную съемку.	стр. 174
	8. Перемещение механизма фокусировки, вызванное неосторожной работой с прибором (взвод затвора, открывание крышки кассеты, и т. д.).	То же.	стр. 174
	9. Неправильно выбран светофильтр при съемке с ахроматическим объективом.	Сменить светофильтр;	стр. 154
		сменить объектив.	стр. 59, 146
	10. Большие аберрации оптической системы.	Сменить объектив или окуляр;	стр. 21
	11. Пластинка заряжена эмульсионной стороной внутрь кассеты.	Правильно зарядить пластинку.	
	12. Прибор неправильно сфокусирован.	Исправить фокусировку.	стр. 144

Дефекты на негативе	Причина возникновения дефекта	Способы устранения	Примечание
Недостаточное почернение фона при методе темного поля	1. Слишком высока апертура объектива.	Уменьшить апертуру объектива.	стр. 39
	2. Неправильно установлен конденсор.	Правильно настроить освещение.	стр. 145
	3. Большая толщина предметного стекла.	Заменить предметное стекло.	стр. 106
Мал контраст при методе фазового контраста	1. Плохо отъюстирована оптическая система.	Отцентрировать изображение кольцевой диафрагмы относительно фазового кольца.	стр. 44, 145
	2. Параметры фазового кольца не соответствуют характеристикам объекта.	Получение хорошего изображения невозможно.	стр. 43
Кадр прозрачный; изображение отсутствует	1. Экспозиция не произведена (не сработал затвор, не переведена призма фотонасадки, погасла лампа).	Повторить съемку.	
	2. Выдержка слишком мала.	Увеличить выдержку.	стр. 172
	3. Перепутан фиксаж и проявитель.	Провести правильную обработку.	
Плотность велика; изображение отсутствует	Фотоматериал засвечен.	Заменить фотоматериал.	
Плотность почернения мала	1. Мала выдержка.	Увеличить выдержку.	стр. 172
	2. Мало время проявления.	Увеличить время проявления.	стр. 117
	3. Низка температура проявителя.	Повысить температуру проявителя; увеличить время проявления.	стр. 117 стр. 119
	4. Истощен проявитель. 5. Проявитель давно приготовлен.	Заменить проявитель (иногда возможно усиление негатива). Увеличить время проявления.	стр. 123
Плотность почернения велика	1. Большая выдержка.	Уменьшить выдержку.	стр. 172
	2. Велико время проявления.	Уменьшить время проявления.	стр. 119
	3. Велика температура проявителя.	Охладить проявитель (иногда возможно ослабление негатива).	стр. 125
Недодержка или передержка при работе с экспонометром	Неправильно определена выдержка.	Ввести необходимую коррекцию.	стр. 104
Беловатый налет или желтые пятна	1. Недостаточна промывка перед фиксированием. 2. Проявитель загрязнен фиксажем. 3. Истощен фиксаж или проявитель.	Хорошо сполоснуть негатив в чистой воде после проявления. Желтые пятна устраняются кислым раствором марганцовокислого калия и хлористого натрия.	стр. 121

Дефекты на негативе	Причина возникновения дефекта	Способы устранения	Примечание
Изображение завуалировано	1. В приборе много рассеянного света.	Вычистить объектив или окуляр; сменить объектив.	стр. 175
	2. Грязь на вспомогательных элементах.	Проверить чистоту препарата, светофильтров, матового стекла, и т. д.	стр. 175
	3. Большая собственная вуаль фотоматериала.	Заменить фотоматериал.	стр. 161
Изображение раздвоено	Во время экспозиции скачкообразно сместился какой-либо элемент: препарат, объектив, окуляр, фотокамера.	Повторить съемку, проверив аппаратуру.	стр. 174
Односторонняя нерезкость изображения	1. Поверхность предметного столика не перпендикулярна оптической оси прибора.	Исправить прибор.	
	2. Клиновидное предметное стекло.	Сменить предметное стекло.	стр. 106
	3. Фотопластинка не перпендикулярна к оптической оси.	Правильно зарядить пластинку или установить кассету.	
Круговая нерезкость	1. Неправильный выбор окуляра.	Для слабых ахроматических объективов выбирать окуляр Гюйгенса, для остальных — компенсационный (при этом нерезкость до конца не устраняется).	стр. 61, 147
	2. Большая кривизна изображения.	Применить планобъектив; заменить окуляр гомалью.	стр. 59, 147; стр. 62, 147
Не все интересующие исследователя изображения структур по глубине препарата резки	Мала глубина резкости.	Уменьшить апертуру объектива.	стр. 137, 142
На резкое изображение важных структур накладываются и мешают изображения других структур	Велика глубина резкости.	Увеличить апертуру объектива.	стр. 137, 142

Дефекты на негативе	Причина возникновения дефекта	Способы устранения	Примечание
Артефакты	1. Грязь в препарате.	Приготовить чистый препарат.	стр. 137
	2. Грязь на оптических деталях (обнаруживается при перемещении соответствующей детали).	Вычистить оптические детали.	стр. 175
	3. Черные полосы на негативе (фрикционная вуаль — дефект пленки).	Сменить пленку.	
	4. Пузырьки воздуха, следы пальцев и т. д.	Аккуратно произвести зарядку и обработку фотоматериала. (Если дефект не устраняется и при повторной съемке находится на том же месте, то он присущ прибору, в противном случае — фотоматериалу или его обработке).	стр. 175, 176
Изображение не покрывает весь кадр	1. Несоответствие угловых размеров кадра и изображения.	Удлинить камеру; сменить окуляр.	стр. 143 стр. 143
	2. Несоответствие размеров изображения полевой диафрагмы и поля зрения микроскопа.	Раскрыть диафрагму; при малых увеличениях уменьшить апертуру конденсора.	стр. 144
Одностороннее виньетирование поля зрения	1. Не центрирована оптическая система.	Отъюстировать оптическую систему.	стр. 144
	2. Мешает посторонняя оправа.	Устранить мешающую оправу.	стр. 144
Неравномерность почернения	1. Плохо настроено освещение.	Правильно настроить освещение.	стр. 144
	2. Плотность спирали ламп не соответствует параметрам оптической системы.	Установить в осветительной системе матовое стекло.	стр. 145
	3. Рефлекс от какой-либо оправы, поверхности линзы или внутренней поверхности тубуса.	Заменить элемент, дающий рефлекс.	стр. 175
Изображение смещено относительно кадрового окна визирной трубки	Неправильное положение светоделительной призмы.	Исправить прибор; вводить коррекцию при съемке.	стр. 174 стр. 174
Дифракционные явления на структурах объекта	1. Затянута апертурная диафрагма.	Раскрыть апертурную диафрагму.	стр. 145
	2. Конденсор в неправильном положении.	Правильно настроить освещение.	

Дефекты на негативе	Причина возникновения дефекта	Способы устранения	Примечание
Дихроичная вуаль желтоватого или коричневатого цвета при рассматривании в отраженном свете	1. Недостаточна промывка перед фиксированием. 2. Проявитель загрязнен фиксажем.	Хорошо споласкивать негатив после проявления; применить кислый фиксаж (удаляется кислым фиксажом или тиомочевиной).	стр. 121
Вертикальные белые полосы на негативе	При проявлении не производилось вращение улитки с пленкой.	Провести правильную обработку фотоматериала.	
Полосы на фотопластинке	При проявлении пластинка помещена в кювету эмульсионным слоем вниз.	То же.	
Повышенный или пониженный контраст	1. Неправильно выбран светофильтр. 2. Неправильно выбран фотоматериал. 3. Применены несоответствующие проявитель и режим обработки. 4. Неправильно выбран размер апертурной диафрагмы.	Подобрать нужный светофильтр. Выбрать соответствующий фотоматериал. Заменить проявитель и установить правильный режим. Правильно настроить освещение.	стр. 153 стр. 163 стр. 117 стр. 144
Вуаль цветного изображения	1. Не выдержан режим обработки. 2. Истощенные растворы.	Соблюдать режим обработки. Применить свежие растворы.	стр. 168 стр. 168
Рыжеватая вуаль цветного изображения	Плохо проведено отбеливание.	Заменить отбеливающий раствор (удаляется повторным отбеливанием и фиксированием)	стр. 168
Частичное сползание цветных эмульсионных слоев	Высокая температура воды при промывке.	Охладить воду; задубить пленку перед обработкой.	стр. 132 стр. 169
Неправильная передача цветов	Несоответствие применяемой пленки цветовой температуре источника света.	Применить коррекционный светофильтр.	стр. 166

ЛИТЕРАТУРА

1. Книги

Аппельт Г. 1959. Введение в методы микроскопического исследования. (Пер. с нем.). М.
Блюмберг И. Б. 1967. Технология обработки фотокиноматериалов. М.
Введение в количественную цитохимию. 1969. Под ред. Г. Вида. (Пер. с англ.). М.
Волосов Д. С., Цивкин М. В. 1960. Теория и расчет светооптических систем. М.
Гороховский Ю. Н. 1960. Спектральные исследования фотографического процесса. М.
Гороховский Ю. Н., Левенберг Т. М. 1963. Общая сенситометрия. М.
Зайцева Л. П., Порохова Т. Г. 1964. Цветная металлография в видимых и ультрафиолетовых лучах. М.
Ильин Р. С., Федотов Т. И., Федин Л. А. 1966. Лабораторные оптические приборы. М.
Каталог изделий Московского электролампового завода. 1959. М.
Каталог изделий Московского электролампового завода. Дополнения и изменения, вып. 1. 1959. М.
Каталог изделий Московского электролампового завода. Дополнения и изменения, вып. 2. 1964. М.
Каталог цветного стекла. 1967. М.
Катушев Я. М., Шеберстов В. И. 1954. Основы теории фотографических процессов. М.
Кириллов Н. И., Антонов С. М. 1951. Процессы цветной фотографии. М.
Киселева С. А., Файвилевич Г. А. 1960. Цветная металлография. М.
Кудряшов Н. Н., Гончаров Б. А. 1959. Специальные виды фотосъемки. М.
Лозинский М. Г. 1956. Высокотемпературная металлография. М.
Люминесцентный анализ. 1961. Под ред. М. А. Константиновой-Шлезенгер. М.
Мархилевич К. И., Яштолд-Говорко В. А. 1959. Фотографическая химия. М.
Маршак И. С. 1963. Импульсные источники света. М.—Л.
Методы цитологического анализа. 1957. Под ред. Р. Меллорса. (Пер. с англ.). М.
Микулин В. П. 1958. Фоторецептурный справочник для фотолюбителей. М.
Минецков И. Б. 1960. Макрофотография. М.
Михель К. 1955. Основы теории микроскопа. (Пер. с нем.). М.
Овсянников Н. А. 1966. Специальная фотография. М.
Ринне Ф., Берек М. 1937. Оптические исследования при помощи поляризационного микроскопа. М.
Ростонер У., Дворак Д. 1967. Микроскопический метод в металловедении. М.
Свойства фотографических материалов на прозрачной подложке. 1955. Сенситометрический справочник под редакцией Ю. Н. Гороховского и С. С. Гилева. Л.
Скворцов Г. Е., Панов В. А., Поляков Н. И., Федин Л. А. 1969. Микроскопы. Л.
Современные методы и техника морфологических исследований. 1955. Под ред. Д. А. Жданова. Л.
Справочная книга по светотехнике, т. I. 1956. Световые приборы и источники света. М.
Тудоровский А. И. Теория оптических приборов. 1948. Т. I, Общая часть; 1952, т. II, Оптические системы. М.—Л.
Турыгин И. А. 1965. Прикладная оптика. Л.
Фабри Ш. 1934. Общее введение в фотометрию. (Пер. с франц.). М.—Л.

Франсон М. 1960. Фазовоконтрастный и интерференционный микроскопы. (Пер. с франц.). М.
Фридман В. М. 1957. Фотография черно-белая, цветная, стереоскопическая. М.
Фотографические и физические методы исследования вещественных доказательств. 1962. Микрофотография, гл. XII, разд. II, стр. 276—291.
Цукерман Л. И. 1950. Практическое руководство по микрофотографии. М.
Чуриловский В. Н. 1966. Теория оптических приборов. М.—Л.
Шерклифф У. 1965. Поляризованный свет. М.
Шиллабер У. 1951. Микрофотография. М.
Allen R. M. 1958. Photomicrography. Ed. 2. Toronto, N. Y.—London.
Applied Optics and Optical Engineering, vol. IV. 1967. N. Y.—London.
Barabás J., Vadász J. 1966. Mikroszkópos fenyképezés (Photomicrography). Budapest.
Barnard J. E. and Welch F. V. 1936. Practical Photomicrography. Ed. 3, London.
Bergner J., Gelbke E., Mehliss W. E. 1961. Einführung in die praktische Mikrofotografie. Halle.
Bode F. 1958. Mikrophotographie für Jedermann. Stuttgart.
Boy M., Lühmann H. und Schweinitz I. 1960. Foto- und Filmtechnik in der Medizin. Halle.
Brain E. B. and Cote A. R. T. 1964. Techniques in Photomicrography. New Jersey.
Farago M. 1954. Mikroszkóp és mikrofotografálás. Budapest.
Fiedler G. 1956. Exakta Makro- und Mikrophotographie. Halle.
Frei-Sulzer M. 1948. Mikrophotographie schwarz-weiß und farbig. Zürich.
Handbuch der Physik. 1927. Bd. XVIII. Berlin.
Hauser F. 1960. Das Arbeiten im auffallenden Licht in der Mikroskopie. Aufl. 2, Leipzig.
Heunert H. H. 1954. Die Nahaufnahme Leitfaden für die Makrophotographie in Wissenschaft und Technik. Berlin.
Heunert H. H. 1959. Praxis der Mikrophotographie. Aufl. 2. Berlin—Göttingen—Heidelberg.
Heunert H. H. und Kurt Ph. 1957. Grundlagen der Schmalfilmtechnik. Leitfaden für die wissenschaftliche Kinematographie. Berlin—Göttingen—Heidelberg.
Jackson A. 1958. Amateur photomicrography. Ed. 7. London—N. Y.
Lawson D. F. 1960. The technique of photomicrography. London.
Malies H. M. 1960. Applied microscopy and photomicrography. London.
Massopust L. C. 1952. Infrared photography in medicine. Illinois.
Michel K. 1949. Grundzüge der Mikrophotographie. Aufl. 3, Jena.
Michel K. 1962. Die wissenschaftliche und angewandte Photographie und Mikrographie, Bd. X. Wien.
Miller R. F. E. 1948. Practical photomicrography. London.
Needham G. H. 1958. The practical use of the microscope including photomicrography. Illinois.
Nürnberg A. 1957. Infrarot-Photographie. Halle.
Oerttel W. O. 1959. Grundlagen der Metallmikroskopie. Leipzig.
Otto L. 1959. Durchlichtmicroskopie. Geräte und Verfahren. Berlin.
Pfeiffer H. H. 1949. Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin. Braunschweig.
Pietsch W. 1955. Die Praxis der Stereo-Nahaufnahmen. Halle.
Pizon P. 1949. Photomacrographie et photomicrographie. Paris.
Russel C. R. 1950. Design of a photomicrographic camera for general laboratory use. London.
Ruthmann A. 1966. Methoden der Zellforschung. Stuttgart.
Schenk R. und Kistler G. 1960. Mikrophotographie. Basel.
Schlemmer J. F.-J. 1956. Základy praktiché makrofotografie a mikrofotografie. Praha.
Schoepf H. 1957. Das Microfoto. Düsseldorf.
Schumann H. 1967. Metallographie. Leipzig.
Stade G. und Staude H. 1958. Mikrophotographie. Aufl. 2, bearbeitet und ergänzt von G. Stade. Leipzig.
Szabö D. 1967. Medical colour Photomicrography. Budapest.
Typholme C. H. S. 1961. Colour photomicrography with a 35-mm camera. London.
Wurst W. 1952. Exakta-Kleinbildfotografie. Halle.

2. Статьи

Агроскин Л. С. 1957. Сравнение яркостей некоторых источников света для ультрафиолетовой микроскопии. Биофизика, 2, 4 : 518.
Александров В. Я. 1954. Упрощенный способ инфильтрации растительных тканей. Бот. журн., 39, 2 : 421—422.

Александров В. Я. 1962. Применение сред, улучшающих микроскопическое изображение при прижизненном изучении растительных клеток. Цитология, 4, 1 : 84—88.
Альтшуллер К. С., Юрьев М. А. 1956. Микрофотографирование в инфракрасных лучах. Природа, 6 : 78—81.
Барский И. Я., Брумберг Е. М., Грамматин А. П., Иванов М. А., Иванова Н. М., Якубенас В. А. 1967. Контактный флуоресцентный микроскоп для медицинских исследований. Оптико-мех. промышл., 12 : 30—34.
Барский И. Я., Зубжицкий Ю. Н. 1961. Получение совмещенных люминесцентно-фазовоконтрастных изображений. Цитология, 3, 1 : 113—117.
Барский И. Я., Хавкин Т. Н. 1969. Фотографический способ микрофлуорометрии при иммуно-люминесцентных исследованиях. Цитология, 10, 11 : 1501—1503.
Барский И. Я., Якубенас В. А. 1964. Установка для импульсной микрофотографии биологических объектов в ультрафиолетовых лучах и свете флуоресценции. В сб.: Электронная и флуоресцентная микроскопия клетки, М.—Л. : 164—168.
Брумберг Е. М. 1939. Новый метод микроскопии в ультрафиолетовом свете. ДАН СССР, 25, 6 : 473.
Брумберг Е. М. 1946. Микроскоп для визуальной цветной микроскопии в ультрафиолетовых лучах. ДАН СССР, 52, 6 : 503.
Брумберг Е. М. 1946. Фотохимический метод ультрафиолетовой микроскопии. ДАН СССР, 51, 8 : 591.
Брумберг Е. М. 1955. О флуоресцентных микроскопах. Журн. общ. биол., 16, 3 : 222—237.
Брумберг Е. М. 1955. Микроскопия в ультрафиолетовых лучах. В сб.: Современные методы и техника морфологических исследований, Л. : 81—108.
Брумберг Е. М. 1956. Ультрафиолетовая флуоресцентная микроскопия. Журн. общ. биол., 17, 6 : 401—412.
Брумберг Е. М. 1959. Флуоресцентная микроскопия биологических объектов при верхнем освещении. Биофизика, 4, 4 : 471—475.
Брумберг Е. М., Барский И. Я. 1961. Микроскоп для ультрафиолетовой флуоресцентной микроскопии. Журн. общ. биол., 22, 6 : 459—466.
Брумберг Е. М., Барский И. Я. 1964. Контактный флуоресцентный микроскоп для медицинских исследований. Архив патологии, 7 : 59—62.
Бутслов М. М., Корн М. Я., Соловьев Н. Н., Ярамышев Г. С. 1966. Установка для цветной микросъемки при помощи электронно-оптического усилителя яркости изображения. Приборы и техника эксперимента, 6 : 167.
Вайдель Г. 1963. Экспонометр-автомат для микрофотографии с помощью насадочной камеры. Иенское обозрение, 2 : 104—108.
Вайдель Г. 1965. Прибор для микрофотосъемки «ST» с устройством для автоматической регулировки выдержки. Иенское обозрение (спец. номер). Весенняя ярмарка 1965 г. в Лейпциге : 17—21.
Виноград М. И., Розенберг В. М., Шапиро М. М. 1962. Современные методы фазового анализа стали и сплавов. Труды ЦНИИЧМ «Новые методы испытаний металлов», М. : 191—203.
Войно-Ясенецкий М. В. 1956. Современные требования к аппаратуре для микрофотографии. В сб.: Вопросы микроскопии, Л. : 72—79.
Захарьевский А. Н., Кузнецова А. Ф. 1961. Интерференционные биологические микроскопы. Цитология, 3, 2 : 213.
Захарьевский А. Н., Панов В. А., Кузнецова А. Ф. 1960. Интерференционный микрообъектив. Оптико-мех. пром., 6 : 34.
Койне Х. 1965. Микрофотосъемка кристаллических осадков неоргано-химических веществ с помощью микрофотографического устройства с экспозиционным автоматом «MF». Иенское обозрение, 3 : 179—184.
Колпаков В. А. 1959. О некоторых способах микрофотосъемки при петрографических исследованиях шлифов с помощью фотоаппаратов различных типов. Изв. высш. учебн. заведений. Цветная металлургия, 4 : 16—22.
Кордюм В. А. 1961. Простой метод импульсной микрофотографии. Лабор. дело, 4 : 50—51.
Королев Ф. А., Одинцов В. И., Ганделов П. А. 1968. О действии мощного лазерного излучения на фотоматериалы. Журн. прикл. спектроскопии, 9, 2 : 318—319.
Кривоборский В. В. 1960. Стереоскопическое микрофотографирование фораминифер. Труды ВНИИГРИ, вып. 153, Л. : 327—334.
Линде К. 1963. Микрофотография в бактериологии. Иенское обозрение, 2 : 87—89.
Ожгихина О. Г., Овчинникова Л. И. 1956. Цветное фотографирование люминесцирующих объектов под микроскопом. Журн. научн. и прикл. фотогр. и кинематогр., 3, 4 : 310—311.

Петков М. А. 1960. Микрофотография. БМЭ, 18 : 487—502.
Романов Н. С. 1955. Микросъемка с увеличенной глубиной резкости. Природа, 9 : 87—88.
Романов Н. С. 1956. О понятиях «макро- и микрофотография». Сб. научных работ по судебной медицине и криминалистике, посв. памяти засл. проф. Н. С. Бокариус. Харьков : 252—254.
Романов Н. С. 1956. Некоторые вопросы микрофотографических исследований криминалистических объектов. Сб. научных работ по судебной медицине и криминалистике, посв. памяти засл. проф. Н. С. Бокариус. Харьков : 247—251.
Романов Н. С. 1956. Из практики микроскопии и микрофотографии при производстве криминалистических экспертиз. В сб.: Теория и практика криминалистических экспертиз, 2. М. : 295—318.
Романов Н. С. 1959. Микроскопические и микрофотографические исследования вещественных доказательств в криминалистической экспертизе. Автореф. канд. дисс. М.
Сванидзе И. К. 1955. Применение бумажных негативов в микрофотографии. Природа, 12 : 107—108.
Скворцов Г. Е. 1967. Развитие микроскопостроения в СССР за 50 лет. Оптико-мех. пром., 11 : 27—35.
Файвилевич Г. А., Кокорин Г. А., Яковлева Е. Ф., Смирнов Ю. И. 1962. Применение методов цветной металлографии к анализу некоторых карбидов и интерметаллидов. Труды ЦНИИЧМ «Новые методы испытаний металлов», М. : 284—300.
Федин Л. А., Агроскин Л. С. 1959. Телевизионный микроскоп — пример применения физических методов исследования в биологии. Биофизика, 4, 4 : 476—482.
Хавкин Т. Н., Барский И. Я. 1968. Получение комбинированных люминесцентно-фазовоконтрастных изображений методом оптического совмещения. Изв. АН СССР, сер. биол., 2 : 276—280.
Шлугер М. А., Власов Е. В. 1953. Простой способ микрофотографирования с помощью бинокулярного микроскопа. Заводская лаборатория, 19, 10 : 1246—1247.
Шпильков Е. М. 1954. Микрофотографирование фотоаппаратом типа ФЭД. Изв. АН КазССР, 126 : 164—169.
Ювченко А. И. 1954. О длиннофокусной микрофотографии в анатомо-морфологических исследованиях. Сб. научн. работ Минск. мед. инст., 14 : 303—311.
Adam H., Wolf F., Friedl U. 1967. Die Super-Rapid Feinhornentwicklung in der Mikrophotographie. Mikroskopie, 21, 7/8 : 206—212.
Albertson C. E. 1964. A light-tent for photomicrography. Microscope, 14, 7 : 253—256.
Alder K. F. 1948. A photoelectric exposure meter for photomicrography. J. Scient. Instrum., 25 : 300—301.
Amies C. R. 1953 (1954). Adapting high-power compound microscope for dissection and photography at low magnification. J. Roy. Microscop. Soc., 73, 4 : 216—219.
Antenen K. 1958. Kamerautomatik für Microphotographie. Microskopie, 13, 9—10 : 325—332.
Appelt H. 1960. Zur Bestimmung der Belichtungszeit bei Mikrophotographischen Schwarzweissaufnahmen. Mikrokosmos, 49 : 263—264.
Atchley F. W. 1958. Low magnification thin section photography. Amer. Mineralogist., 43 : 997—1000.
Automatic photo-micro camera. 1961. Perspective, 3, 4 : 313—315.
Baker H. M., Garrett H. L., Sutton E. J. 1969. Some advantages of analytical techniques by stereophotography with the light and electron microscopes. Microscope, 17, 1 : 19—24.
Balgenkamera 4×5 mit Belichtungsautomatik. 1967. Leitz-Mitt., 4, 1/2 : 56—57.
Barabas J. 1960. Mikroskóp fényképezö jeltét. Képés hangtechnika, 6, 5 : 160.
Barer R. 1950. Learning about the invisible, ultra-violet and infra-red photomicrography. Photogr. J., 90B : 83—91.
Bartels P. H. 1966. Photomicrography. Details for Success. Visual Medicine, 1 : 42.
Bech E. 1961. Der Farbfilm in der Mikrophotographie. Mikrokosmos, 50 : 22—27.
Benford J. R., Butterfield J. V. 1954. Improved photomicrographic lenses. JOSA, 44, 4 : 351.
Benford J. R., Butterfield J. V. 1954. A new series of photomicrographic lenses. JOSA, 44, 8 : 598—600.
Berek M. 1927. Uber Kohärenz und Konsonanz des Lichtes. Z. Physik, 40, 6 : 420.
Bergner J. 1952. Der Elektronenblitz in der Mikrofotografie. Feingerätetechnik, 1 : 394.
Bergner J. 1953. Grundlagen der Kleinbild-Mikrofotografie im polarisierten Licht. Fotografie, 7 : 187—190, 195.

Bergner J. 1956. Polarisationsmikroskop und Farbenfotografie. Bild und Ton, 9, 3 : 66—69.
Bergner J. 1956. Verwacklungsunschärfen bei der Mikrofotografie mit der Kleinbildkamera. Fototechn. Rdsch. in Wiss. u. Praxis, 1 : 21.
Bergner J. 1956. Über die objektgetreue Wiedergabe in der Kleinbild-Mikrofotografie. Fotografie, 10 : 184.
Bergner J. 1959. Die Verwendung von Aufsetzkameras bei Mikrofotografie mit polarisiertem Licht. Jenaer Rundschau, 4, 2 : 62—65.
Bernhard P. 1955. Mikrophotographie. Techn. Rundschau, 47, 24 : 2—3.
Bevis R. E. and Hetrick W. F. 1952. Flash in photomicrography. Science, 115, 2994 : 550—551.
Beyeller U. 1954. Beitrag zur Mikrophotographie von Schneekristallen. Naturwiss. Rundschau, 7, 2 : 71—74.
Bode F. 1953. Die Technik mikrophotographischer Lebendaufnahmen mit Niedervoltlichtquellen. Naturwiss. Rundschau, 6, 11 : 468—470.
Bode F. 1953. Besondere Beleuchtungsmethoden in der Mikrophotographie unter Verwendung des Elektronenblitzlichtes. Mikroskopie, 8, 7/8 : 257—259.
Bode F. 1966. Möglichkeiten der Mikrophotographie — ein Überblick. Photo-Techn. und Wirtsch., 17, 6 : 252—256.
Böhme 1953. Neue Methoden der Mikro-Stereoskopie und ihre photographische Auswertung. Photo-Techn. und Wirtsch., 4, 6 : 218—219.
Botherel D. A. 1955. Photography in the laboratory. part IV. Photomicrography. Lab. Practice, 4, 12 : 497—500.
Bradley C. W. 1960. A new photographic apparatus. Photogr. J., 100, 8 : 251—255.
Branemark P. J. and Jonsson J. 1964. Photomicrographic and cinematomicrographic equipment for use with flash illumination. J. Roy. Microscop. Soc., 82, ser. III, part 4 : 245—249.
Bromley J. P. 1969. Ultramakrophotographie mit Mikroskopobjektiven. Jenaer Rundschau, 14, 1 : 37—39.
Brünner G. 1956. Dokumentenfilm als Aufnahmematerial in der Kleinbild-Mikrofotografie. Mikrokosmos, 45 : 188.
Bryson H. C. 1954. Simplified photomicrography. Lab. Practice, 3, 9 : 377—383.
Butcher B. R., McDonald L. A. 1956. A recording camera for metallography with polarized light. J. Inst. Metals, 84, 11 : 454—459.
Butterfield J. V. 1954. New flat-field eyepieces for photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 22 : 145—149.
Castenholz A. «Mikrohymographie» — ein Verfahren zur Registrierung von Bewegungsvorgängen im mikroskopischen Bereich. Z. wiss. Mikroskopie, 68, 4 : 193—207.
Cliffe P. 1952. Motion photomicrography. Med. and Biol. Illustr. 2 : 43—50.
Cole W. V. 1948. Polarised light photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 16 : 147—150.
Coulon F. 1953/54. Ultrarot in der Mikroskopie. Mikrokosmos, 43 : 284—286.
Dade H. A. 1953. A photomicrographic apparatus for 35 mm film. J. Quekett Microscop. Club, 3, 8 : 463—479.
Dade H. A. 1954. Further notes on 35 mm photomicrography. J. Quekett. Microscop. Club, 4, 2 : 91—109.
Dahme E. 1963. Photomikroskope und ihre praktische Anwendung in der Histologie. Zeiss Information, 11 : 26—27.
Dawson M. 1963. Apparatus for the study of living human cells. J. Roy. Microscop. Soc., 82, ser. III, part 1 : 1—22.
Dawson M., Dryden W. F. and Matthews J. E. 1964. Apparatus for the study of human cells — some improvements. J. Roy. Microscop. Soc., 83, ser. III, part 4 : 391—395.
Deckart M. 1955. Methoden stereoskopischer Mikrofotografie und Mikroprojektion. Mikrokosmos, 44 : 261—264.
Deckart M. 1962. Optische Belichtungsmessung für die Mikrophotographie. Mikrokosmos. 51 : 280—284.
Delly J. G. 1969. Light filters in visual microscopy. Microscope, 17, 3 : 193—200.
Diebold K. 1953. Praktische Methoden und Geräte für die Kleinbildmikrophotographie. Acta techn. Acad. scient. Hung., 7, 3—4 : 341—357.
Diebold K. 1954. Metallográfiai mikrofényképezes kisméretü negativ anyagra. Kohász. lapok, 9, 1 (Öntöde) : 17—20; 2 : 33—40.
Dluhos L., Mihulka F. 1956. Mikrofotografie bez fotografického pristroje. Přírod. vědy škole, 6, 2 : 164—167.
Dragesco J. 1953. Microphotographie à l'aide des éclairs éléctroniques. Mikroskopie, 8, 7/8 : 254—257.
Driesen H. H., Rösch S. 1956. Erfahrungen in der stereoskopischen Mikrophotographie. Mikrokosmos, 45 : 105—107.
Duijn C. van. 1958. Moderne Beobachtungsverfahren in der Mikroskopie und deren Bedeutung für die Mikrokinematographie. Res. Film, 3 : 1—17.

Eder H. und Fritsche H. 1963. Zur Farbphotographie fluoreszenzmikroskopischer Objekte. Leitz-Mitt., 2, 2 : 143—145.
Ein neuer Belichtungsmesser für die Mikrophotographie. 1960. Leitz-Mitt., 6, 6 : 190.
Exposure photometers for photomicrography. 1950. J. Biol. Photogr. Assoc., 18 : 60—64.
Faasch W., 1961. Lösung ungewöhnlicher Aufgaben. Monatl. fototechn. Mitt., 9, 11 : 420—421.
Faugust W. D. 1956. Photomicrography simplified. Industr. Labs., 7, 4 : 122—125.
Fischer H. A. 1953. Means for producing microphotographs having a three-dimensional effect. Патент США № 2639653, 26. 05. 1953.
Follmann G. 1959. Kleine Original-Mitteilungen. Ein neuer binokularer Mikrophotoaufsatz. Z. wiss. Mikroskopie, 64, 4 : 247—248.
Fournier G. 1956. New methods and techniques in the photography of microfossils. Micropaleontology, 2, 1 : 54.
Frenk H. 1961. Einige Probleme der automatischen Mikrophotographie und ihre Lösung in der Mikro-Photo-Automatik von Leitz. Leitz-Mitt., 1, 8 : 228—235.
Frenk H. 1962. «Orthomat» — vollautomatische Aufsetzkamera für Mikroskope. Med.-Markt, 10, 5 : 224—226.
Freund H. 1966. Mikroskopische Photographie im Wandel der Zeiten. Photogr. Korrespondenz, 102, 2 : 21—26.
Fully automatic camera fits any microscope. 1961. J. Franklin Instr., 272, 7 : 340—341.
Gabler F., Kropp K. und Schödl O. 1964. Eine Elektronenblitzeinrichtung für die Mikrophotographie. Mikroskopie, 19, 5/6 : 149—156.
Gander R. 1962. Die Eichung der Mikrophoto- und Mikrokinoapparatur. Mikroskopie, 17, 9/10 : 494—499.
Germain H. et Jessenne J. 1951. L'emploi de la cellule photoéléctrique pour la détermination du temps de pose en microphotographie. Microsc., ser. 2, 1 : 119—122.
Gibson H. L. 1954. Photomacrography of insects. J. Biol. Photogr. Assoc., 22 : 93—110.
Gibson H., Buckley W. R. and Whitmore K. E. 1965. New vistas in infrared photography for biological surveys. J. Biol. Photogr. Assoc., 33 : 1—33.
Gibson R. E. 1960. Some problems of colour photomicrography. Mikroskope, 12, 6 : 155—158.
Gierlach Z. S. 1955. Fluorescence microscopy and photomicrography. M. Radiogr. Photogr., 31 : 110—119.
Göke G. 1959. Rerpofilme in der Mikrophotographie. Mikrokosmos, 48 : 61—63.
Göke G. 1964. Mikrophotographie mit dem Stereomikroskope. Mikrokosmos, 53 : 181—186.
Grabner A. 1946. Mikrofotografie in Farben. Mikroskopie, 1, 1/2 : 29.
Grabner A. 1946. Schärfentiefe und Abbildungsmaβstab bei der Lupenfotografie. Mikroskopie, 1, 3/4 : 106.
Grabner A. 1956. Microfotografia a colori ed in bianco e neu. Lab. Scient., 4, 7 : 97—110.
Grand C. G. 1953. Light meter for microphotography. Патент США № 2659268, 17 11 1953.
Gündel W. 1957. Photoelektrische Belichtungszeitmessung in der Mikrophotographie und Mikrokinematographie. Naturwiss. Rundschau, 10, 6 : 232—233.
Habermalz F. 1967. Spektrale Empfindlichkeit von Kleinbildfilmen für die Mikrophotographie und Anwendung an Lichtfiltern. Mikroskopie, 22, 3/4 : 62—70.
Harrison N. 1955. Zeiss equipment for photomicrography. Brit. J. Photogr., 102, 4963 : 314—317.
Haselmann H. 1961. Colour photomicrography-experience and practical application. J. Roy. Microscop, Soc., 79, part 4 : 277—286.
Haselmann H. 1961. Farb-Mikrophotographie-Grundlagen und Praxis. Zeiss-Mitt., 2 : 128—149.
Haselmann H. and Habermalz F. 1967. Basic problems in colour photomicrography. J. Roy. Microscop. Soc., 86, part 4 : 343—347.
Haselmann H. und Wittekind D. 1957. Phasenkontrast Fluoreszenz Mikroskopie. Z. wiss. Mikroskopie, 63, 4 : 216—226.
Hause W. A. 1952. Focusing tube for photomicrography. Amer. J. Clin. Pathol., 22 : 712.
Heerd E. 1967. Zur Technik der Infrarot-Photographie mit dem Interferenzmikroskop. Z. wiss. Mikroskopie, 68, 4 : 208—218.
Heydemann B. 1964. Über die Bedeutung der Nah- und Makroaufnahmen für die Analyse von Sitzhaltungen bei Insekten und Spinnen. Leitz-Mitt., 3, 2 : 50—54.
Heyse E. 1950. Lichtfilter und Detailwiedergabe in der Mikrophotographie. Röntgenphotogr., 3 : 158—161.
Höltge G. 1950. Grundsätzliches zur Mikrophotographie. Röntgen-Bl., 3 : 39—53.

H o l z H. M. 1956. Der Gebrauch von Farbfiltern in der Mikrophotographie. Zeiss-Werkzeitschrift, 4, 22 : 106—110.
H ü b e r P. 1966. Ein selbstgebautes Lichtmeßgerät für mikrophotographische Zwecke. Mikroskopie, 21, 11/12 : 297—302.
H u m m e l G. 1960. Die Bestimmung der Belichtungszeit bei der Mikrophotographie. Mikrokosmos, 49 : 218—224.
J a r r e t t B. A. 1953. Photomicrography of moving specimens. J. Photogr. Sci., 1 3 : 97—108.
K ä l i n J. 1962. Belichtungszeitbestimmung mit Halbleiterelement. Mikrokosmos, 51 : 47—54.
K a r l s r u h e r H. 1961. A method of registering magnification on photomicrographs by the superexposure of a scale on the same negative. J. Roy. Microscop. Soc., 80 : 99—100.
K e l l e r E. G. 1951. One-shot photomicrographic camera. J. Biol. Photogr. Assoc., 19 : 138—140.
K e s s e l A. M. and C r i s p L. R. 1951. A specially constructed instrument for taking photomicrographs of histological preparations. J. Biol. Photogr. Assoc., 19 : 67—72.
K h a w k i n T. N., B a r s k y I. Ja. 1969. Die optische Kongruenz bei der Analyse von Mikrofotografien. Med. Bild, 12, 1 : 35—38.
K i n g R. J., R o e E. M. F. 1954. Photomicrography with the Burch reflecting microscope. J. Roy. Microscop. Soc., 74, 2 : 64—68.
K i n k e a d W. K. 1955. Photography through the microscope. Princeton Engr., 16, 3 : 26—27.
K l e i n b i l d k a m e r a - M i k r o s k o p «Mikrophot». Naturwiss. Rundschau, 6, 11 : 474—475.
K l o s e v y c h S. 1960. Photomicrography — the phase-contrast. J. Biol. Photogr. Assoc., 28 : 89—95.
K l o s e v y c h S. 1963. Photomicrography-polarized light technique. J. Biol. Photogr. Assoc., 31 : 1—9.
K l o s e v y c h S. 1966. Photomicrography — importance of the collector lens. J. Biol. Photogr. Assoc., 34 : 45—50.
K o a n a Z., W a k i m o t o Z. 1965. Lenses for ultra-microphotography. Proc. Confer. Photogr. and Spectroscop. Optics. Tokyo : 113—119.
K o e l b l o e d D. 1961. Ein einfacher mikrophotographischer Belichtungsmesser. Mikrokosmos, 50 : 315—317.
K ö h l e r F. 1955. Verwendung eines normalen Taschenbelichtungsmessers für die Mikrophotographie. Naturwiss. Rundschau, 8, 11 : 445.
K o m b i n i e r t e r binokularer Beobachtungs- und Fototubus. 1961. Export. Anz. Konsümgüt. Ausg., 15, D12 (33) : 25—26.
K o o t e n H. van, G r o o t e n d o r s t W. J. M. and O o r d t van P. G. W. J. 1967. The production of three dimensional photographs of the vascular system in the head of the common frog *Rana temporaria*. Mikroskopie, 22, 9/10 : 265—269.
K o r n m a n n H. 1964. Das Polaroid-Aufnahmeverfahren und seine Anwendung in der metallographischen Mikrophotographie. Praktische Metallographie, 1 : 11—18.
K o r n m a n n H. und S t e i n b a c k K. 1964. Das Polaroid-Verfahren in der Mikrophotographie. Leitz-Mitt., 3, 2 : 33—38.
K o s c h e l K. W. 1965. A simple light meter for Microphotography. Lab. Practice, 14, 3 : 285.
K r u g H. 1962. Grundlagen und Methodik der photographischen Mikrospektrophotometrie. Acta histochem., 14 : 42—58.
K u h l W. 1961. Zur Anwendung des Schmalfilmes in der Zellforschung. Mikroskopie, 16, 9/10 : 264—273.
K u h l W. 1962. Zwei Hilfseinrichtungen für Mikro- und Makrofilmaufnahmen. Res. Film, 4 : 378.
K u h l W. 1966. Photoobjektive als «Tubuslinsen» beim einfachen Mikroskop bei Mikrofilmaufnahmen. Z. wiss. Mikroskopie, 67, 4 : 232—239.
K u r t M. 1962. Photomikroskop. Патент ФРГ. 42h, 15/02 (G02d), № 1022817, 20. 09. 1962.
L a p h o t o g r a p h i e des couleurs en microscopie. 1953. Bull. Soc. franç. photogr. et cinematogr., 3, 2 : 46—47.
L a n d E. H. 1952. Colour with ultra-violet. Med. and Biol. Illustr., 2 : 118—123.
L a u r e n c e E. 1960. Thoughts about 35-mm photomicrography. Microscope, 12, 7 : 180—185.
L e i t z E. 1955. Perfectionnements en microphotographie des matériaux. Usine nouvelle, 11, 4 : 35.
L e s t e r H. M., R i c h a r d s O. W. 1954. Stereo-photomicrography with cameras of fitted interocular distance. Photogr. Engng, 5, 3 : 149—160.
L e v i J. D. 1957. Colour photomicrography of colourless objects. Nature, 179, 4557 : 494.

Lichtfilter für Mikroskopie und Mikrophotographie. 1959. Druckschriften № 30-328-1. C. Zeiss. Jena.
L'impiego di una camera microfotografica. 1956. Lab. Scient., 4, 2 : 52—57.
Linde K. 1963. Mikrophotographie in der Bakteriologe. Jenaer Rundschau, 8, 2 : 87—89.
Lindern L. V. 1961. Zur Mikrophotographie der Bahnspuren von geladenen Elementarteilchen in Kernemulsionen. Z. wiss. Mikroskopie, 65, 2 : 113—117.
Littmann G. 1965. Spaltbildphotographie. Zeiss-Informationen, 13 : 43—51.
Lombardi P. 1956. Considerazioni sulle micrografie a colori su alcuni ettoni comuni da lavorazione plastica. Metallurgia ital., 49, 3 : 181—185.
Long A. G. 1953. A synchronized miniature reflex attachment. Functional Photography, 4, 9 : 14—15.
Lorant M. 1953. Applications of the Libessart spark gap to photomicrography. Functional Photography, 4, 11 : 10—12.
Loveland R. P. 1949. Colour photomicrography in the laboratory. Analyt. Chem., 21 : 467—475.
Lucey E. 1953. Use of the «S. E. 1.» exposure photometer for the direct calculation of exposure in photomicrography. Res. Film, 2 : 27—29.
Ludwig C. 1961. Eine neue mikrophotographische Aufsetzkamera mit automatischer Belichtungs-Regelung von Leitz. Leitz-Mitt., 1, 8 : 225—228.
Ludwig C. 1962. Neue Mikroskop-Aufsetzkamera mit Belichtungs-Automatik. Med.-Markt, 10, 2 : 57.
Ludwig C. 1963. Das Aufnahmematerial für die Schwarz-Weiß wiedergabe. Leitz-Mitt., 2 : 168—172.
Machowicz P. and Powell E. W. 1954. A sensitive inexpensive light meter for photomicrography. Science, 120, 3114 : 394—395.
Mai G. und Heine U. 1959. Beschreibung einer Mikrofilmeinrichtung mit Zeitraffung. Z. wiss. Mikroskopie, 64, 2 : 65—72.
Mandel E. 1953. Fluorescence photography in colour. Brit. J. Photogr., 106, 4846 : 407—408.
Manigault P. 1951. Le collection du photomicrographie. Sa mise en valeur par les procédés modernes de classement des négatifs, des épreuves, des préparations microscopiques. Bull. microsc. appl. : 155—158.
Manigault P. 1957. Progrès récents des techniques photomicrographiques. Bull. microsc. appl., 7, 2 : 39—48.
Manigault P. et Tchan Y. T. 1950. Utilisation pratique d'un posemètre en photomicrographie. Ann. Inst. Pasteur, 78 : 684—686.
McWhorter Fr. P. and Leach Ch. M. 1966. Contact photomicrography in the ultraviolet on high-resolution plates. Science, 152, 3723 : 757—758.
Mehliss W. E. 1954. Über das Arbeiten mit mikrofotografischen Einrichtungen. Bild und Ton, 7, 7 : 195—197; 8 : 226—228; 9 : 264—267, 279.
Meyer-Arendt J. 1953. Zur Lichtmessung in der Mikrophotographie. Klin. Wochenschr., 31 : 1101—1102.
Michel K. 1951. Makrofotografie-Mikrofotografie. Foto Prisma : 198—200.
Michel K. 1952. Mikrophotographie in Wissenschaft und Technik. Naturwiss. Rundschau, 5, 4 : 134—139.
Michel K. 1952. Zur Mikrophotographie mit der Kleinbildkamera. Photogr. u. Forsch., 5 : 49—56.
Michel K. 1953. Mikrophotographie mit der Kleinbildkamera. Photo-Techn. und Wirtsch., 4, 9 : 337—338.
Michel K. 1953. Zur Verwendung des Elektronenblitzes in der Mikrophotographie. Photogr. u. Forsch., 5 : 140—148.
Miflex-Universal-Aufsatzkamera. 1953. Druckschriften. № CZ-30-605a-1. C. Zeiss, Jena.
Millendorf H. 1958. Un nuovo espasimetro per la microfotografia. Lab. Scient., 6, 4 : 117—123.
Miller O. E. 1950. Colour temperature. Its use in colour photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 18 : 150—158.
Mineo J. E. 1953. Rapid exposures in colour photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 21 : 45—46.
Mineo J. E. 1953. Universal exposure meter for photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 21 : 40.
Möllring F. K. 1959. Praxis der Farb-Mikrophotographie. Zeiss-Werkzeitschr., 7 : 32—37.
Möllring F. K. 1964. Die Möglichkeit der optischen Anpassung von Filmkameras an das Mikroskop. Zeiss-Informationen, 12 : 126—131.
Moss H. 1953. A universal optical bench. Microscope, 9, 10 : 257—265.
Mutschke E. 1950/51. Die Verwendung von Lichtfiltern in der Mikrofotografie, Mikrokosmos, 40 : 242.

Myers M. L. 1958. Mineral photography. Negatives and prints from thin sections of quartz and agate. PSA Journal, 24, 6 : 36—37.
Nagappa Y. 1954. Photography of thin sections. Micropaleontologist, 8, 1 : 38.
Neubecker R. D. 1952. Technique for taking 35-mm colour photomicrographs. U. S. Armed Forces Med. J., 3 : 1055—1060.
Norris J. F., Meiller F. H., Bolen K. T., Grisp L. R. 1961. Photomicrographic microscope for both micro-and macroapplication. JOSA, 51, 7 : 445—446.
Nouveau photomicroscope universel. 1964. Mécanique électricité, 48, 176 : 63.
Oettel W. 1965. Large incident-light camera microscope. Metallurgia, 72, 434 : 293—295.
Orloff L. 1954. Observation and study microscopic objects through photomicrography. Chemistry, 27, 9 : 88—89.
Otto L. 1952. Fluoreszenzmikroskopie. Feingerätetechnik, 1 : 291—297.
Otto L. 1953. Noch einmal Unterbelichtung und Langentwicklung. Fotografie, 3 : 75—77.
Otto L. 1958. Lumineszenzmikrophotographie. Jenaer Rundschau, 3, 1 : 17—20.
Photomicroscope. 1958. Analyt. Chem., 30, 6 : 76.
Photomicrographs: a simple method. 1954. Text. Weekly, 53, 1354 : 596.
Poetschke G. 1954. Mikrophotographie mit dem Phasenkontrastverfahren. Photo-Mag., 63.
Prestige M. C. 1963. Moving slit microscopy for high resolution micrography of objects in curved planes. Med. Electr. Biol. Engin., 1, 4 : 561.
Presting W. und Dornick H. 1956. Mikrophotographie in Lumineszenzlicht; ein Beispiel aus dem Gebiet der organischen Chemie. Fototechn. Rdsch. in Wiss. und Praxis, 1 : 36.
Price Z. H. 1948. An auxiliary base for use in photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 17 : 59.
Price R. and Christenson L. R. 1957. Combined phase and fluorescence microscopy. Mikroskopie, 12, 516 : 147—151.
Przeniosło S. 1959. O celowos ci wyherzystania fotografii barnej w mineralogii i petrografii. Przegl. geol., 7, 1 : 29—30.
Pulsford J. M. 1959. Low magnification thin section photography. Amer. Mineralogist, 44, 11—12 : 1306—1307.
Rasin-Streden R. und Purt G. 1958. Belichtungsmessung bei Mikroaufnahmen. Radex Rundschau, 5 : 235—239.
Reynolds K. A. 1960. The use of photometers for determination of exposure time in photomicrography. Mikroskope, 12, 6 : 148—155.
Richards O. W. 1951. Stereo-Photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 19 : 7—15.
Rienitz J. 1967 (1968). Kritik des Positiv-Negativ-Verfahrens und der mikroskopischen Reliefverfahren (schiefe Beleuchtung, Schierenmikroskopie und Shearing-Interferenzmikroskopie). Mikroskopie, 22, 7/8 : 169—193.
Saavedra A. 1964. Anwendung der Dunkelfeldphotographie in der Gerichtsmedizin. Leitz-Mitt., 3, 1 : 15—17.
Sauer Fr. 1966. Die Gefrierätztechnik in der Macrophotographie. Mikrokosmos, 55 : 297—299.
Schaefer A. 1969. Die Automatisierung in Mikroskopie und Mikrophotographie. Mikrotechnic, 23, 1 : 64—68.
Scharf J. H. 1951. Über die Verwendung des photographischen Vergrößerungsgerätes zur Darstellung großer Schnittpräparate in der wissenschaftlichen Mikrophotographie. Mikroskopie, 6, 7/8 : 254—255.
Scharf J. H. 1951. Zur Frage der Wahl des Aufnahmematerials in der wissenschaftlichen Mikrofotografie. Mikroskopie, 6, 11/12 : 383—389.
Scharf J. H. 1953. Photographische Darstellung großer und dicker Schnittpräparate bei schwacher Vergrößerung im polarisierten Licht. Photogr. u. Wiss., Agfa-Mitt., 2 : 3—7.
Scharf J. H. 1954. Zur Mikro- und Makrofotografie im polarisierten Licht. Naturwiss. Rundschau, 7, 10 : 431—435.
Scharf J. H. 1956. Observations on methods of polarization photomicrography. Med. and Biol. Illustr., 6, 2 : 112—122.
Scharf J. H. 1961. Gesichtspunkte bei der Einrichtung mikrophotographischer Laboratorien. Z. med. Labortechn., 2 : 193—203.
Scheminzky F. 1947. Behelfsmäßige Mikrophotographie durch das Kameraobjektiv hindurch. Mikroskopie, 2, 5/6 : 165—169.
Scheminzky F. 1948. Photographie des Fluoreszenzspektrums schwacher oder millimeterkleiner Leuchter. Spectrochim. acta, 3 : 191—205.
Schenk R. 1955. Methods of determining exposure time in photomicrography. Röntgen u. Lab. Praxis, 8 : 205—211.

Schneebell G. L. 1965. Accessory splitbeam prism for cinemicrographic procedures. J. Roy. Microscop. Soc., 84, part. 3 : 393—394.
Schoepf H. 1953. Anwendung von Lichtfiltern für Mikroaufnahmen. Naturwiss. Rundschau, 6, 7 : 194—295.
Schoepf H. 1953. Negativmateriale für mikrophotographische Aufnahmen. Naturwiss. Rundschau, 6, 3 : 119.
Schrader M. 1964. Die Eichung bei der Belichtungszeitbestimmung mittels eines photowiderstandes in der Mikrophotographie. Mikroskopie, 19, 3/4 : 92—102.
Schrader M. 1964. Transistorisierte für die Mikrophotographie. Z. wiss. Mikroskopie, 65 : 409—425.
Schulz H. 1965. Der Photowiderstand ORP63 in der Mikrophotographie. Mikrokosmos, 54 : 57—62.
Schümmelfelder N. 1957. Fluoreszenzmikroskopische Histochemie und Farbphotographie. Photogr. u. Wiss., 3/4 : 19.
Shurcliff W. A. 1952. The polaroid color-translating ultraviolet microscope. Lab. Investig., 1 : 123—128.
Siering H. 1959. Die Phasenkontrast-Mikrophotographie. Naturwiss. Rundschau, 12, 7 : 148—151.
Simon W. 1965. Photomicrography of deep fields. Rev. Scient. Instrum., 36, 11 : 1654—1655.
Slevens R. B., Taylor J. H. 1948. Photomicrography at your convenience. Science, 108, 2807 : 410.
Smith R. F. 1954. The use of polarized light in the photography of unstained histological radioautographs of plant tissue. J. Biol. Photogr. Assoc., 22 : 15—16.
Smithson F. 1954. Photomicrography with a Kellner eyepiece. Nature, 173, 4413 : 1043—1048.
Soares J. M. P. and Dos Santos E. C. 1952. The Sabattier effect in photomicrography. Microscope, 9 : 5—12.
Spannhoff L. 1954. Eine Methode zur exakten Bestimmung der Belichtungszeit in der Mikrophotographie. Mikroskopie, 9, 1/4 : 110—113.
Spies F. 1966. Kleinbildphotographie am Metallmikroskop mit der vollautomatischen Orthomat-Kamera. Leitz-Mitt., 8, 7 : 193—202.
Spurr A. R. 1955. Colour photomicrography of fluorescent plant material. J. Biol. Photogr. Assoc., 23 : 79—85.
Stadelmann E. 1963. Eine mikrophotographische Zeitrafferanlage mit Auswertevorrichtung. Z. wiss. Mikroskopie, 65, 3 : 172—185.
Steche W. 1954. Zur Belichtung von Mikroaufnahmen. Mikrokosmos, 43 : 191.
Stevenson D. G. 1951. Histological Photomicrography. J. Scient. Instrum., 28: 275.
Strömberg A. 1952. A method for rapid photographing of microscopical objects. Geologiska Föreningens Stockh., Förh. 74, 3 : 386—389.
Stürmer W. 1966. Die Mikro-Stereoaufnahme (MSA) in der Paläontologie. Photogr. Korrespondenz, 102 : 163—167.
Szabó D. 1961. Measurement of exposure times in photomicrography Kép és Rangtechnika, 3 : 73.
Tchan Y. T. 1957. Phase-fluorescence microscopy. Nature, 179, 4572 : 1243—1244.
Triebel E. 1958. Die Photographie im Dienste der Mikropaläontologie. In: Handbuch der Mikroskopie in der Technik, Bd. 11, 3.
Tronnier H. and Wagener H. H. 1951. New photoelectric intensity meter for photomicrography. Mikroskopie, 6, 11/12 : 333—339.
Universal exposure meter for photomicrography. 1953. J. Biol. Photogr. Assoc., 21 : 40.
Un nouveau microscope à chambre photographique. Composants électron. 1964. Pièce détachée, 55 : 38.
Vetter J. P. 1963. The production and use of Rheinberg colour differential filters. J. Biol. Photogr. Assoc., 31 : 15—19.
Viret J. P. 1959. Amplificateur à transistors pour posemètres photoélectriques. Mikroskopie, 14 : 284—287.
Wang H. and Dooman J. 1952. A low-power photomicrographic camera. J. Biol. Photogr. Assoc., 20 : 127—129.
Wardlaw F. 1950. Exposure meter for use in photomicrography. J. B. P. Record, 29 : 186—187.
Wardlaw F. 1950. Exposure photometers for photomicrography. J. Biol. Photogr. Assoc., 18 : 60—64.
Wasner K. 1965. Kamera-und/oder Projektionsmikroskop. (C. Reichert optische Werke Aht.-Ges.). Австр. патент, кл. 42h, 12/07 (G02b) N 261256, 30. 08. 1965.
Waterkeyn L. 1959. Procédé nouveau donnont de bonnesq vues d'ensemble de préparations microscopiques peu contrastées Bull. microsc. appl., 9, 5—6 : 103—107.
Weber J. 1950. Photomicrography with the concentrated arc lamp. J. Biol. Photogr. Assoc., 18 : 127—138.

Weber K. 1968. Lichtmikroskope (Jahres-Übersicht). VDI-Zeitschrift, 110, 7 : 288—291.
Webster S. H., Liljegren E. J. and Zimmer D. J. 1948. Photomicrography of moving objects by electronic photoflash technique. J. Biol. Photogr. Assoc., 16 : 99—102.
Weidel G. 1953. Aus Theorie und Praxis der Kleinbild-Mikrofotografie. Fotografie, 4 : 98—100, 104; 5 : 128—130, 134—135.
Weidel G. 1956. Aus Theorie und Praxis der Kleinbild-Mikrofotografie. Jenaer Rundschau, 3 : 76—85.
Weidel G. 1960. Mikroskopie und Mikrofotografie mit Zeiss-Geräten. Z. med. Labortechnik, 1 : 255—314.
Weidel G. 1960. Neue Bauteile der mikrophotographischen Einrichtung «MF». Jenaer Rundschau, 1 : 21—33.
Weidel G. 1960. Mikrophotographische Einrichtung «MF-Standard». Jenaer Rundschau, 5, 4 : 135—137.
Weidel G. 1963. Eine Belichtungsautomatik für die Mikrophotographie mit der Aufsetzkamera. Jenaer Rundschau, 8, 2 : 104—108.
Wellford W. T. 1961. Condensing systems for illumination in photomicrography. J. Quekett Microscop. Club., 5, 13 : 370—372.
Westom R. M. 1964. A photometric eyepiece for exposure estimation in photomicrography. J. Roy. Microscop. Soc., 82, part. III : 211—213.
Widmann H. 1961. Mikrophotographie und Innere Medizin. Zeiss-Mitt., 2 : 149—155.
Willnow R. 1953. Elektronenblitz-Mikrofotografie. Fotografie, 2 : 49—50.
Wilson D. P. 1953. Electronic-flash photomicrography. Discovery, 14, 11 : 347—349.
Yos D. A. 1969. Photomicrography with the science and mechanics exposure meter. Microscope, 17, 2 : 119—123.
Zastrow K. 1958. Mikrofotografische Aufnahmen von Dünnschliffen. Z. angew. Geol., 4, 12 : 579.
Zastrow K. 1959. Zur Herstellung schwach vergrößerter Mikroaufnahmen mit der Kleinbildkamera. Z. angew. Geol., 5, 10 : 499—500.
Zeiss Aufsetzkamera zur Mikrophotographie mit Belichtungsautomatik. 1966. Zeiss-Inform., 61 : 104—106.
Zeiss camera microscope for steel research. 1966. Metal Treatment, 33, 252 : 354—367.

Литература, опубликованная за время подготовки книги к печати

Гороховский Ю. Н., Баранова В. П. 1970. Свойства черно-белых фотографических пленок. М.
Brain E. B. 1969. Techniques in photomicrography. Aufl. 2, Edinburgh.
Loveland R. P. 1970. Photomicrography: A comprehensive treatise (2 vols). London, New York.
Ehrich. 1969. Reversal color film reproduction fidelity in photomicrography. Microscope, 17, 2 : 97—104.
McLachlan D. 23 may 1968. A deep focus photographic microscope. New Scientist.
Polaroid Land Instruments Camera. 1970. Mikroskopie, 25, 1/8.
Schilling V. 1969. Luminar Einrichtung für das Format 24×36 mm mit variablen Abbildungsmaßstäben zum Standard Mikroskop. Z. wiss. Mikroskopie, 69 : 182—184.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Аберрация 21, 58
— сферическая 22, 60
— хроматическая 23
Абсорбция 10, 39, 41
Адаптация 23
Аккомодация 23, 26
Активность оптическая 15
Амплитуда 5, 10, 42
Анализатор 42
Анизотропия 13, 41
Апертура 35, 38, 58, 137
— выходная 35, 54
— осветительная 38, 137
— численная 29
Астигматизм 22

Вибрация 173
Волна 11
— когерентная 11
— плоская 9
— поляризованная 13
— сферическая 9, 17
— электромагнитная (световая) 5, 42
Волны длина 5
Время экспонирования 114, 169
Вуаль 162
Выдержка 114, 162, 169
Выход квантовой флуоресценции 16
— энергетический флуоресценции 50

Глаз 23
Глаза зрачок 30
— разрешающая способность 24
— чувствительность спектральная 23, 150
— — пороговая 23
— — — контрастная 23
Глубина волновая 34, 137
— геометрическая 34, 137
— резкого изображения 34, 137, 142, 196
Гомаль 33, 62, 147

Двулучепреломление (двойное лучепреломление) 14, 15, 42
Диатомея 36
Диафрагма апертурная 17, 29, 38, 62, 144
— — конденсора 39
— кольцевая 45
— окуляра 39, 144
— полевая 30, 38, 144
Диск Эри 20
Дисперсия 9, 23
— двулучепреломления 15
— оптической активности 15
— плеохроизма 15
Дисторсия 22
Дифракция 20, 35
Дифракционное изображение 21, 61
Длина камеры 32, 137
Длина тубуса 60, 146, 147
— — механическая 60
— — оптическая 27, 28, 31
Доза облучения 161

Жидкость иммерсионная 29, 58, 107

Зернистость 115, 161
Зернистости фактор 116
Зрачок входной 17, 29, 34, 51
— выходной 17, 21, 29, 34

Излучение видимое 5
— инфракрасное 5
— монохроматическое 5
— ультрафиолетовое 5
Изображение действительное 17, 26
— мнимое 17, 26
Изоопака 144, 162
Иммерсия 29, 58, 107, 146
Инверсия изображения 44
Интенсивность 6, 10, 12, 42
Интервал оптический 19
Интерференция 11, 47
Источник излучения точечный 9

Камера пластиночная 148
— пленочная 148
Картина интерференционная 13
Количество освещения 8, 109
Коллектор 38
Кольцо фазовое 45, 64
Кома 22
Компенсатор 42
Конденсор 38, 40, 62
— темного поля 62
— универсальный 63
— фазового контраста 63
Коноскопия 42
Контраст 23, 53, 153
— аноптральный 45
— фазовый 42
— — негативный 44
— — позитивный 44
Контрастность фотографического материала 111
Корректар 31, 61
Коэффициент контрастности 111, 162
— — максимальный 112
— — рекомендованный 112
— отражения 8, 11, 53
— поглощения 10, 16, 53
— пропускания 10, 53, 151
Кратность светофильтра 157, 169
Кривая характеристическая 109

Кривизна изображения 22, 58, 146
Кружок рассеяния 22, 34

Лампа газоразрядная 68
— импульсная 191
— ксеноновая 68
— накаливания 64
— ртутная 68
Линза Бертрана 42
— тубусная 28, 60
— фронтальная 40, 58
Линии спектральные 6
Лупа 149
Луч 9
— главный 9
— необыкновенный 15
— обыкновенный 14
— отраженный 10
— падающий 10
— преломленный 10
Люк 30, 38
— входной 30, 51
— выходной 30
Люкс 9
Люкс-секунда 9
Люмен 9
Люминесценция 15
Люминесценции время затухания 15
— выход 15

Масло кедровое 107
Масштаб изображения 31, 37, 137, 140, 196
Материал фотографический изопанхроматический 117
— — инфрахроматический 117
— — несенсибилизированный 117
— — ортохроматический 117
— — панхроматический 117
— — сенсибилизированный 117
Метод интерференционного контраста 46, 55, 180
— исследования в поляризованном свете 41, 55, 187
— — в свете флуоресценции 49, 56, 182
— косого освещения 39, 55
— освещения по Кёлеру 38
— светлого поля 39, 55
— темного поля 39, 55, 145, 179
— фазового контраста 42, 55, 145, 180, 187
— цветовой трансформации 182
Метода исследования выбор 136
Механизм фокусировки 57, 148
Микропланар 31, 61
Микроскоп биологический 70
— интерференционный 46
— инфракрасный 51
— металлографический 77
— поляризационный 41, 75
— сравнения 190
— стереоскопический 96
— ультрафиолетовый 51, 75, 181
— универсальный 79
— фазовоконтрастный 44, 46
— флуоресцентный 49, 73
Микроскопия контактная 186
Микрофотонасадка 87

Нит 9

Объект-микрометр 140
Объектив 25, 58, 146
— апохроматический 59, 146
— ахроматический 58, 146
— зеркально-линзовый 59
— иммерсионный 29, 146
— монохромат 59
— полуапохроматический 59
— фазовоконтрастный 45, 60
— фазовотемнопольный 45
Окуляр 25, 61, 147
— Гюйгенса 61, 147
— измерительный 62
— Кельнера 61
— компенсационный 61, 147
— ортоскопический 61
— Рамсдена 61
Опак-иллюминатор 40, 50
Оправа коррекционная 60, 146
Ореол 46
Ортоскопия 42
Освещение комбинированное 50
Освещенность 7, 37, 54, 137, 143, 169, 196
Ослабление изображения 123
Острота зрения 24, 25, 35, 137
Ось оптическая кристалла 14
Отбеливание 130
Отверстие относительное 195
Отражение полное внутреннее 11

Период колебания 5
Печать контактная 163
— проекционная 163
Планобъективы 59
Пластинка Бека 40, 60
— «полволны» 48
— фазовая 45
Плеохроизм 15, 42
— круговой 15
Плоскость главная 18
— колебания 10
— падения 10
— фокальная 17
Плотность 10
— спектральная потока излучения 6
Поверхность Ламберта (идеально рассеивающая) 8
Показатель преломления 9
Покрытие просветляющее 54
Поле зрения 29, 30, 137, 144
— — линейное 30
Полосы интерференционные 12
— равной толщины 12
— равного наклона 13
Поляризатор 41
Поляризация 13
— круговая 13
— линейная 13
— флуоресценции 16
— эллиптическая 13
Порядок интерференции 12
Потери лучистой энергии (света) 52
Поток излучения (световой) 6, 38, 51, 65
Почернение негатива 111
Призма Наше 41
Проекция изображения 31
Пространство изображений 16
— предметов 16
Проявитель 118
— выравнивающий 121

— мелкозернистый 120
— цветной 129
Проявление 117, 129
Псевдостереоэффект 24
Пучок гомоцентрический 16
— лучей 9, 16

Разность фаз 12
— хода 12
Разрешающая способность 21, 35, 37, 46, 137, 139
Расстояние наилучшего видения 23, 25, 137
— объектива рабочее 27
— — свободное 27
Раствор останавливающий 131
Револьвер 57
Рельеф фазовый 42

Свет белый 6
— дифрагированный 20
— естественный 13
— поляризованный 13, 15
Светность 7
Светосила 29
Светофильтр 150, 178
— абсорбционный 151
— дневного света 154
— запирающий 49, 182
— интерференционный 151
— компенсационный 152, 166
— контрастирующий 153
— корригирующий 154
— нейтральный 155
— селективный 154
— теплозащитный 151, 157
Светочувствительность фотоматериала 112
— общая 113, 160
— спектральная 113, 150, 160
Свеча 9
Сетка 27
Сечение главное 14
Сила оптическая 19
— света 8
Система анастигматическая 22
— апланатическая 22
— апохроматическая 23
— ахроматическая 23
— ортоскопическая 22
— осветительная 143
— отрицательная 19
— положительная 19
— проекционная 31
Скорость распространения излучения (света) 5, 9
Скрещенность светофильтров 50, 182
Спектр 6
— поглощения 16
— флуоресценции 16
Способ освещения по Кёлеру 144
Среда анизотропная 13
— изотропная 13
Стекло покровное 60, 105, 146
— предметное 105, 145
Стекла цветного набор 151
Степень поляризации 15
Стереомикрофотографирование 96
Стильб 9
Столик предметный 57

Температура цветовая 64, 70, 166, 193
— яркостная 64
Трубка световая 51, 52
Тубус 57
Тубусодержатель 58

Увеличение 18
— линейное 18
— микроскопа 25
— объектива 27, 137
— окуляра 28, 32, 137
— полезное 35, 137
— продольное 18
Угловой размер изображения 25, 54
— — предмета 25
Угол апертурный 17, 21, 29, 36
— отражения 10
— падения 10
— поворота плоскости поляризации 15, 42
— преломления 10
— телесный 8, 52, 54
Усиление изображения 123

Фаза 9, 42
— колебания 5, 11
Фигура интерференционная 42
Фиксаж 122
Фиксирование 121, 130
Флуоресценция 15
— ультрафиолетовая 50, 184
Фокус 17, 26
Фокусное расстояние 18, 26
Формула Ньютона 18
Фосфоресценция 16
Фотокамера 149
Фотолюминесценция 15
Фотометрирование 75
Фотонасадка 87
Фотомикроскоп 79
Фотообъектив 34
Фотоокуляр 62, 147
Фотоэкспонометр 104

Хроматизм положения 23, 58
— увеличения 23, 59
Хромоскоп 182

Цвет 6, 64
Цветность источника света 64

Частота колебания 5
Черное тело 7
Число диафрагменное 195

Ширинг-микроскоп 48
Широта фотографическая 110

Экспозиция 109, 112
Экспонометр 171
Энергия возбуждения 15
— излучения 15
Эпиконденсор 41
Эпиобъектив 60
Эталон силы света 9

Явление невзаимозаместимости 114, 162
Яркость 8, 54, 64, 69, 137, 192

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

Введение 3

Список обозначений 4

Глава I. Общие положения 5

1. Электромагнитное излучение 5
2. Некоторые сведения из физической оптики 9
   Распространение излучения в материальной среде 9
   Интерференция 11
   Поляризация 13
   Люминесценция 15
3. Основные законы геометрической оптики 16
4. Дифракция и ее роль в образовании изображения 20
5. Аберрации оптической системы 21
6. Характеристики глаза 23

Глава II. Основные сведения из теории микроскопа 25

1. Увеличение и ход лучей в микроскопе 25
2. Ограничение световых пучков в микроскопе 29
3. Проекция изображения при микрофотографировании 31
4. Глубина резкого изображения 34
5. Разрешающая способность и полезное увеличение 35
6. Осветительная система и методы освещения 37
7. Методы микроскопии с применением дополнительных оптических средств 41
   Метод исследования в поляризованном свете 41
   Метод фазового контраста. 42
   Метод интерференционного контраста 46
   Метод исследования в свете флуоресценции 49
   Метод исследования в спектральных диапазонах за пределами видимой области 51
8. Прохождение света через микроскоп 51
9. Освещенность изображения 54

Глава III. Аппаратура для микрофотографирования 57

1. Объективы, окуляры и конденсоры 58
   Микрообъективы 58
   Окуляры 61
   Конденсоры 62
2. Фазовоконтрастные устройства 64
3. Источники света 64
   Лампы накаливания 64
   Газоразрядные лампы 68
4. Биологические микроскопы 70
5. Специализированные биологические микроскопы 73
6. Поляризационные микроскопы 75
7. Металлографические микроскопы 77
8. Универсальные микроскопы и фотомикроскопы 79
9. Микрофотонасадки 87
10. Установки для микро- и макрофотографии 94
11. Стереоскопические микроскопы и стереомикрофотографирование 96
    Стереоскопические микроскопы по схеме Грену 98
    Стереоскопические микроскопы типа «Цитопласт» 98
    Фотографирование на стереоскопических микроскопах 100
    Стереофотографирование с обычным микроскопом 102

Стр.

12. Принадлежности для микрофотографирования и вспомогательные материалы . . . 103
Осветители . . . 103
Фотоэкспонометры . . . 104
Предметные и покровные стекла . . . 105
Иммерсионные жидкости . . . 107

Глава IV. Фотографические материалы и их обработка . . . 109

1. Основные свойства фотографических материалов . . . 109
Характеристическая кривая . . . 109
Фотографическая широта . . . 110
Контрастность фотографического материала . . . 111
Светочувствительность фотографического материала . . . 112
Зернистость фотографического материала . . . 115
Разрешающая способность фотографического материала . . . 116
2. Обработка фотографических материалов . . . 117
Проявление . . . 117
Фиксирование . . . 121
Усиление и ослабление изображения . . . 123
Специальные методы обработки фотографических материалов . . . 126
3. Цветные многослойные фотографические материалы и их обработка 127

Глава V. Практика микрофотографирования . . . 136

1. Требования к объектам . . . 136
2. Выбор параметров микроскопа . . . 137
3. Выбор аппаратуры и настройка ее для работы . . . 143
4. Выбор светофильтров . . . 150
5. Выбор черно-белых фотографических материалов . . . 159
6. Выбор цветных фотографических материалов . . . 165
7. Экспонометрия . . . 169
8. Некоторые дополнительные рекомендации из практики микрофотографии . . . 172

Глава VI. Различные виды микрофотографирования . . . 178

§ 1. Микрофотографирование биологических объектов . . . 178
1. Фотографирование окрашенных препаратов . . . 178
2. Фотографирование неокрашенных препаратов . . . 179
3. Фотографирование в ультрафиолетовых лучах . . . 180
Метод цветовой трансформации . . . 182
4. Фотографирование в свете видимой флуоресценции . . . 182
5. Фотографирование в свете ультрафиолетовой флуоресценции . . . 184
6. Прижизненное микрофотографирование . . . 185
§ 2. Микросъемка в металлографии . . . 186
§ 3. Микрофотографирование в поляризованном свете . . . 187
§ 4. Специальные виды микрофотографии . . . 189
§ 5. Импульсная микрофотография . . . 191
§ 6. Применение микрофотографии для количественных исследований 193

Глава VII. Макрофотография . . . 195

Приложения:

I. Соотношения коэффициентов пропускания и оптической плотности 198
II. Возможные ошибки в микрофотографии и их устранение . . . 200

Литература . . . 205
Предметный указатель . . . 217

ИСПРАВЛЕНИЯ И ОПЕЧАТКИ

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
18	9 сверху (формула 36)	$Q = A_1' A / A_1 A$	$Q = A_1' A' / A_1 A$
20	Рис. 15, б — график	T_B	$\bar{T}_B$
36	13 снизу	$\sin \psi - i$	$\sin(\psi - i)$
37	17 сверху	$-\frac{0.61\lambda}{A} \quad \bar{\Gamma} =$	$\frac{0.61\lambda}{A} \bar{\Gamma} =$
43	22 снизу	фаз δ,	фаз δ',
51	22 сверху	только здесь применяется	здесь применяется только
54	12 снизу (формула 95)	$\sin^2 u'$	$\sin^2 u'_m$
54	5 снизу	Угол ω	Угол w
54	4 »	$\omega = 20°$	$w = 20°$
64	17 »	гл. X.	гл. VI.
69	Подпись к рис. 49, 1 снизу	лампы.	лампы; *1* — балластное сопротивление; *2* — лампа; *3* — амперметр; *4* — поджигающее устройство.
76	12 снизу	шлицевое	щипцевое
88	8 »	рис. 56.	рис. 57.
88	2 »	56,	57,
130	6 сверху	проявителя	проявителя)
141	5 »	рис. 120)	рис. 120 *)
150	Рис. 135	$\delta_{0.5\ \lambda_{макс}}$	$\delta_{0.5\ \tau_{макс}}$
151	9 сверху	$\delta_{0.5\ \lambda_{макс}}$	$\delta_{0.5\ \tau_{макс}}$
152	17 снизу	панхроматическом	изопанхроматическом
160	2 »	КС-14.	КС-14, характеристики пластинок УФШ-3 даны для $\lambda = 280$ нм.
169	2 »	стр. 133	стр. 137
171	6 сверху	$\frac{0.09}{0.91}$	$\frac{0.09}{0.81}$
181	Табл. 20, графа 1 справа, 1 сверху	+ УФС2 (8)	+ УФС2 (2)

Л. А. Федин и И. Я. Барский

ИЛЛЮСТРАЦИИ

(МИКРОФОТОГРАФИИ)[1]

[1] В тексте ссылки на эти иллюстрации помечены звездочкой (*).

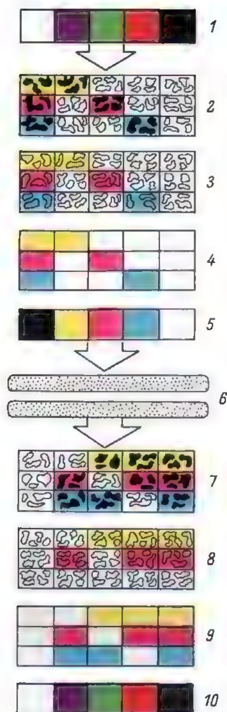


Рис. 115. Схема негативно-позитивного цветного процесса.

1 — объект; 2 — проявление; 3 — отбеливание; 4 — фиксирование; 5 — негатив; 6 — экспонирование позитива; 7 — проявление; 8 — отбеливание; 9 — фиксирование; 10 — позитив.

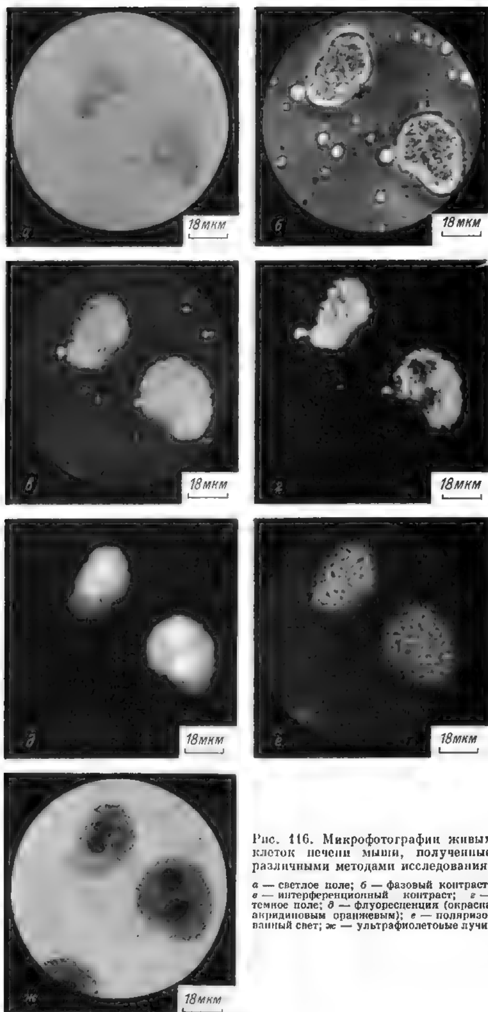


Рис. 116. Микрофотографии живых клеток печени мыши, полученные различными методами исследования.

а — светлое поле; *б* — фазовый контраст; *в* — интерференционный контраст; *г* — темное поле; *д* — флуоресценция (окраска акридиновым оранжевым); *е* — поляризованный свет; *ж* — ультрафиолетовые лучи.

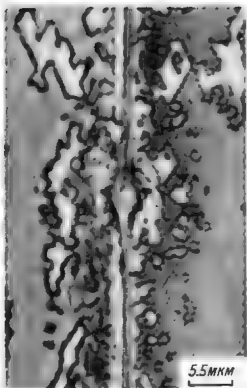


Рис. 117. Микрофотографии диатомеи *Pleurosigma angulatum*. Левая половина снята в желто-зеленом, правая — в фиолетовом свете.

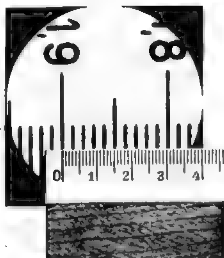


Рис. 120. Определение масштаба изображения.

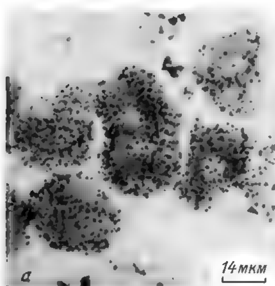




Рис. 119. Микрофотографии клеток печени мыши (реакция на сукцинидегидрогеназу).
а — при β=1000 A; *б* — при β=3000 A.

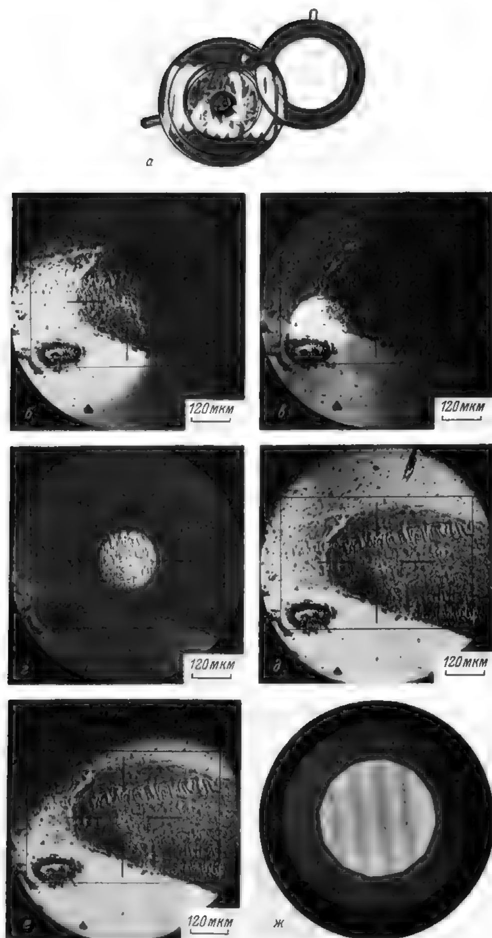


Рис. 124. Настройка освещения.

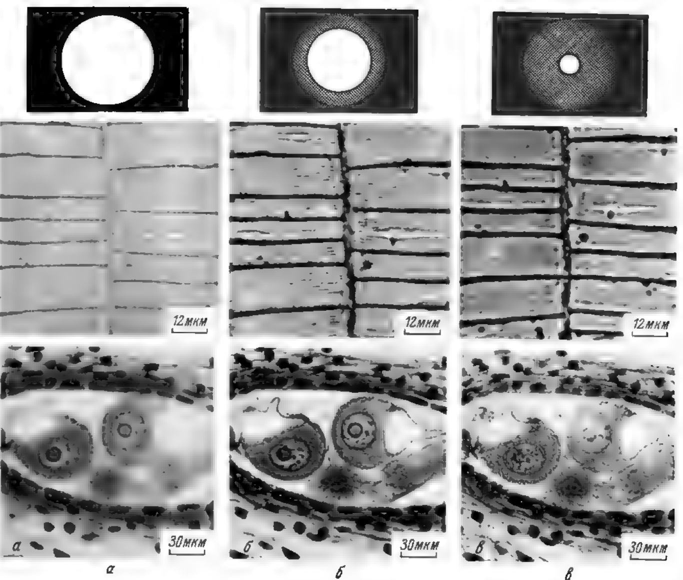


Рис. 126. Микрофотографии диатомеи *Surella gemma* (средний ряд) и среза цветка *Rudbickia laciriata*, окрашенного по Фёльгену и Оранж *G* (нижний ряд) при различных отношениях диаметров изображения апертурной диафрагмы и выходного зрачка объектива (верхний ряд).

а — при 1 : 1; *б* — при 2 : 3; *в* — при 1 : 4.

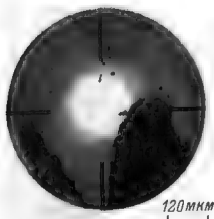


Рис. 125. Три изображения диафрагмы в поле зрения.

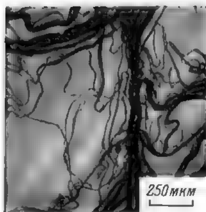
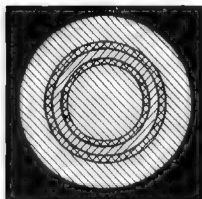
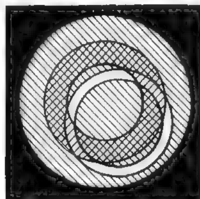
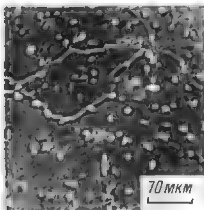


Рис. 127. Неравномерное освещение поля зрения при малом увеличении.





а *б*



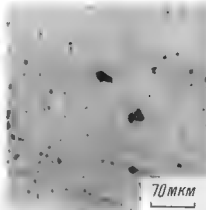


Рис. 128. Микрофотографии шлифа стали.

а — при правильной настройке системы фазового контраста; *б* — при неправильной настройке. Вверху указаны соответствующие положения колец в зрачке объектива.

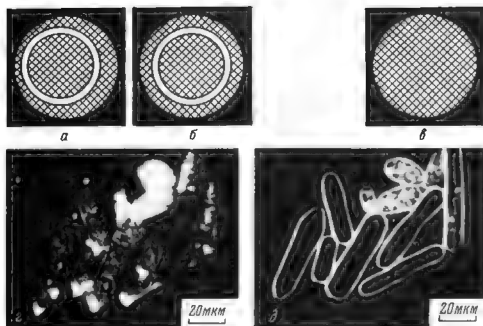


Рис. 129. Настройка освещения по методу темного поля.

а — вид зрачка при нецентрированном конденсоре; *б* — то же при центрированном конденсоре; *в* — то же при правильно сфокусированном конденсоре; *г* — микрофотография дрожжей *Endomices* при плохой настройке освещения; *д* — вид с того же объекта при правильной настройке освещения.

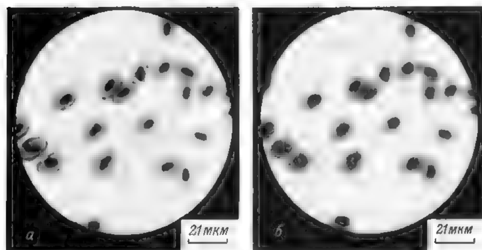


Рис. 130. Микрофотографии клеток крови лягушки.

а — покровное стекло нормальной толщины; *б* — толстое покровное стекло.

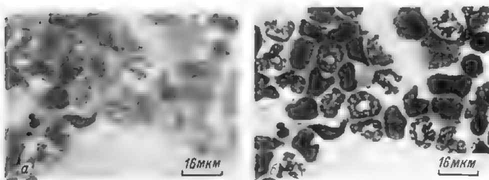


Рис. 131. Микрофотографии клеток костного мозга крысы, полученные с ахроматическим объективом.

а — в белом свете; *б* — с зеленым светофильтром.

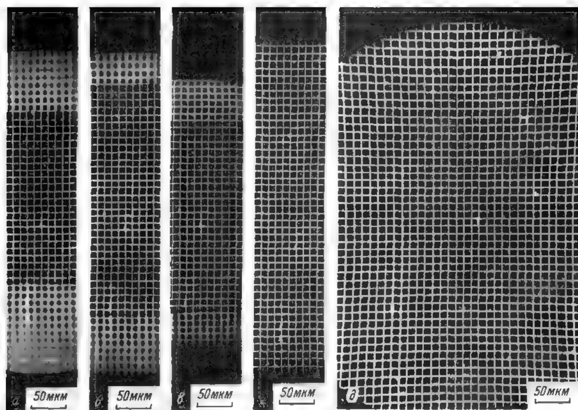


Рис. 132. Микрофотографии сетки.

а — ахроматический объектив и окуляр Гюйгенса, фокусировка на центр поля зрения; *б* — то же но при фокусировке на среднюю зону; *в* — ахроматический объектив и гомаль; *г* — планахроматический объектив и компенсационный окуляр; *д* — тот же объектив и окуляр с увеличенным полем зрения.

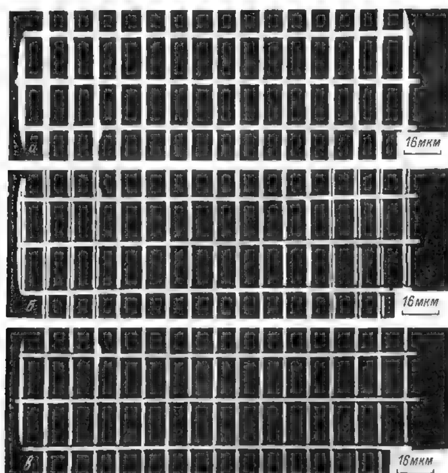
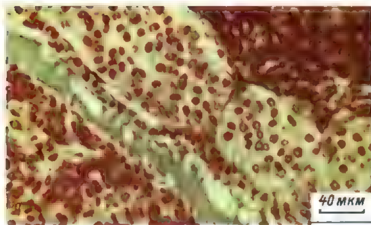
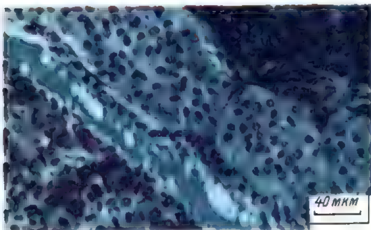


Рис. 133. Микрофотографии сетки с планахроматическим объективом и окуляром Гюйгенса.

а — в белом свете; *б* — с пурпурным светофильтром ПС11; *в* — с зеленым светофильтром ЗС1.





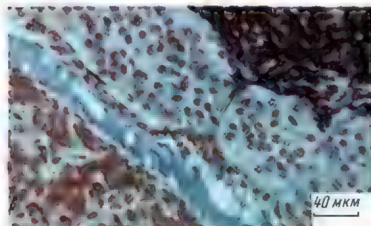
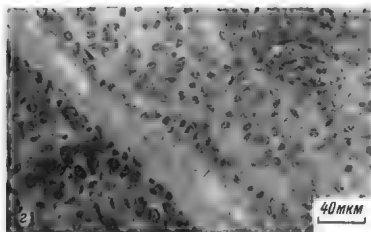
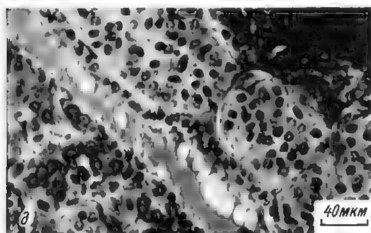


Рис. 136. Микрофотографии среза гипофиза крысы (окраска: паральдегид-фуксин+азан), снятые на цветном и панхроматическом материалах.

а — конденсор ниже нормального положения (фон красноватый); *б* — конденсор приподнят (фон синеватый); *в* — конденсор в правильном положении (фон нормального цвета).





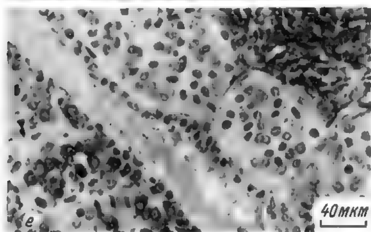


Рис. 136 (*продолжение*).

г — без светофильтра, изображение вялое; *д* — со светофильтром ЗС8 хорошо передаются клетки передней и промежуточной долей, но структуры нейрогипофиза слишком контрастны; *е* — со светофильтром СС2, контраст оптимален во всех участках изображения.

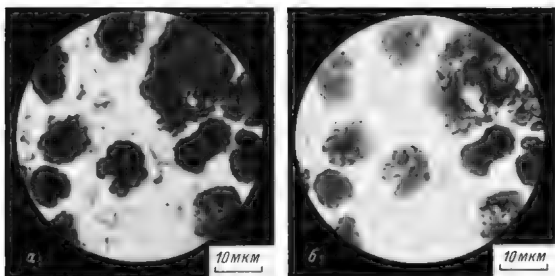


Рис. 137. Микрофотографии скопления телец вируса орнитоза в макрофаге сальника белой мыши (вокруг макрофага группа лейкоцитов. Окраска по Романовскому—Гимза), снятые на изоортохроматическом материале.

а — светофильтр ЗС1; *б* — светофильтр ОС11.

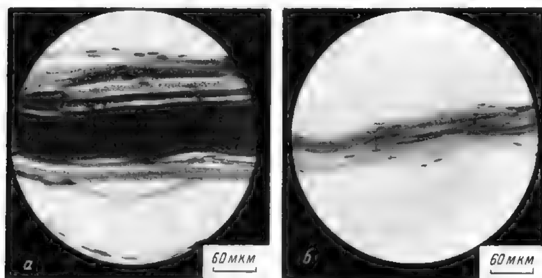
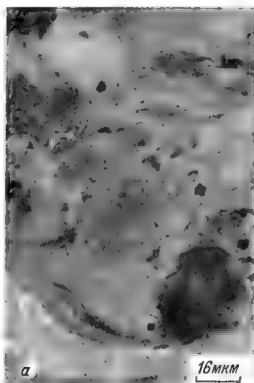
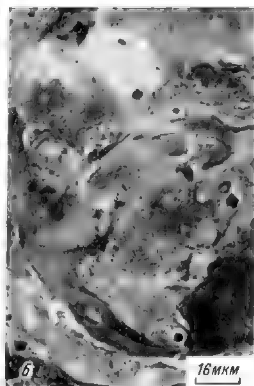


Рис. 138. Микрофотографии нервных волокон лягушки (окраска гематоксилином Бёмера на нейрокератиновую сеть), снятые на панхроматическом материале.

а — светофильтр ЗС1; *б* — светофильтр КС10.





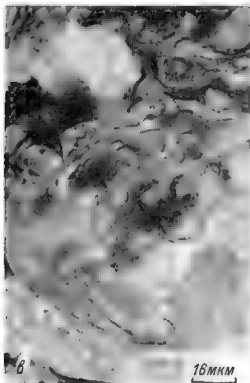


Рис. 139. Микрофотографии среза почки кролика (экспериментальный амилоидный нефроз, окраска по Маллори), снятые на панхроматическом материале.

а — без светофильтра; *б* — светофильтр ЗС1; *в* — светофильтр КС10.

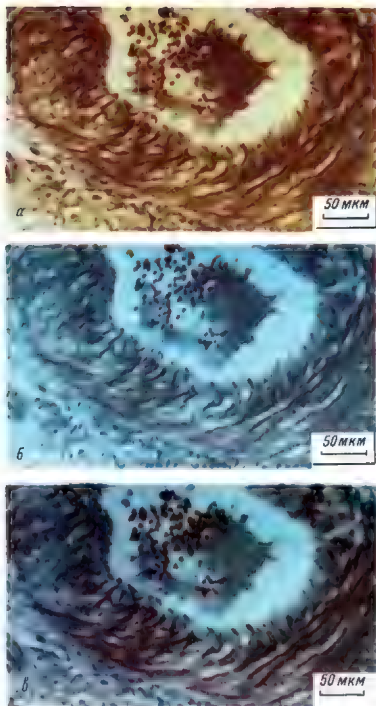
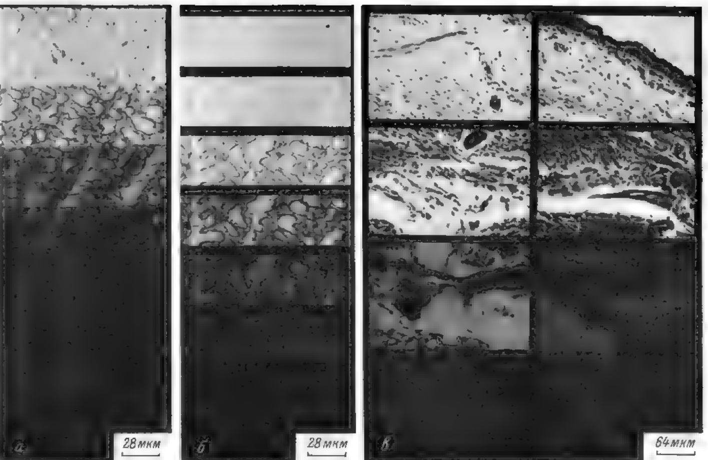


Рис. 145. Микрофотографии среза почки кролика (окраска по Маллори).

а — пленка дневного света ДС-5 экспонирована от лампы накаливания; б — пленка искусственного света ЛН-5 экспонирована от ксеноновой лампы; в — пленка ЛН-5 в сочетании с лампой накаливания.



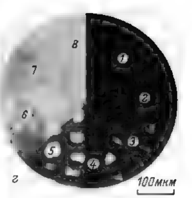


Рис. 147. Микрофотографии, снятые для определения выдержки.

а — с кассетой с градуированной шкалой; *б* — с мультипликатором; *в* — с вкладышами; *г* — со ступенчатым ослабителем.

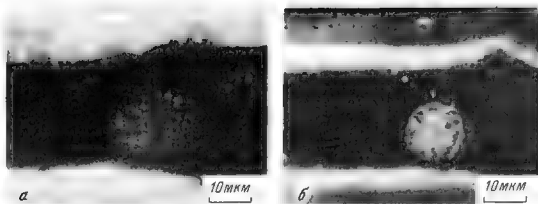


Рис. 149. Микрофотографии эпидермальной клетки пленки лука в темном поле.
а — объект в воде; *б* — объект в силиконовом масле с $n_D=1.477$.

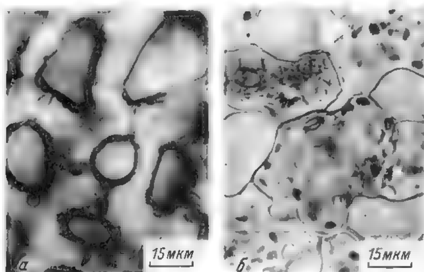


Рис. 150. Микрофотографии паренхимы листа *Campanula percicifolia.*

а — до очистки от воздушных пузырьков; *б* — после очистки.

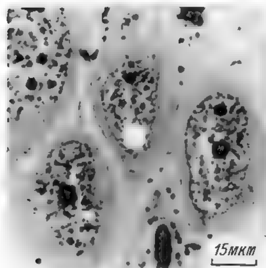
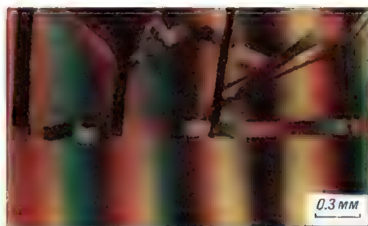


Рис. 151. Блик в поле зрения.



Рис. 152. Дефекты в поле зрения.



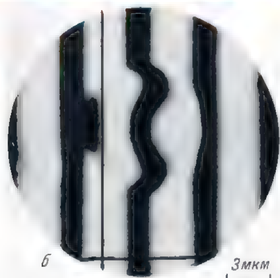
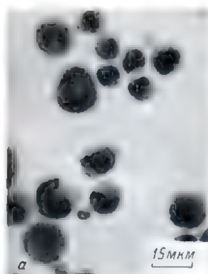


Рис. 154. Микрофотографии, полученные на интерференционном микроскопе.

а — крыло стрекозы; *б* — эритроцит человека.



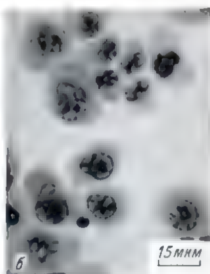


Рис. 156. Микрофотографии асцитных клеток мыши, снятые в лучах 250—280 нм (газовый светофильтр). Источник — ртутная лампа СВД-120А при токе 2 а. Конденсор с апертурой *А* 0.8.

а — живые клетки; *б* — клетки через 5 мин. облучения.

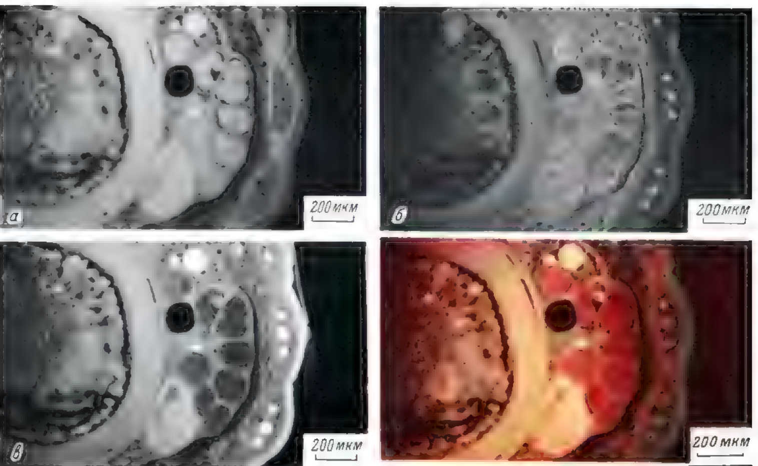


Рис. 158. Микрофотографии среза хвоста мыши в свете ультрафиолетовой флуоресценции.

а — при $\lambda = (300-320)$ нм; *б* — при $\lambda = (420-450)$ нм; *в* — при $\lambda = (340-380)$ нм; *г* — цветной снимок, полученный на хромоскопе

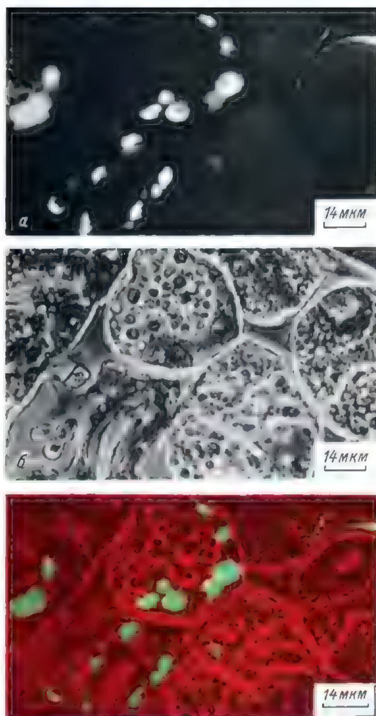


Рис. 160. Микрофотографии эпителиальных клеток кишечника клеща, зараженного риккетсиями Бернета.

а — в свете флуоресценции (метод Кунса); *б* — метод фазового контраста; *в* — цветной снимок, полученный на хромоскопе.

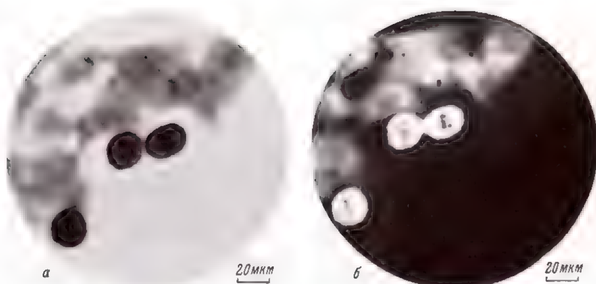


Рис. 162. Микрофотографии клеток культуры ткани амниона человека.
а — в проходящих УФ лучах с $\lambda = 250-280$ нм; *б* — в лучах УФ флуоресценции с $\lambda = 320-380$ нм.

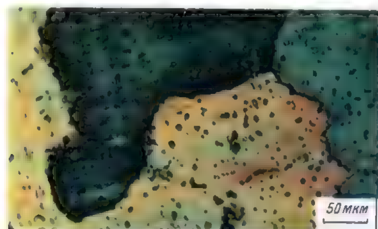


Рис. 163. Микрофотография шлифа стали, полученная по методу интерференционного контраста.

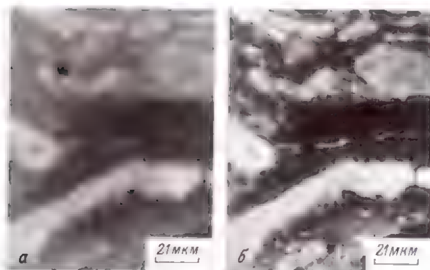


Рис. 165. Микрофотографии аншлифа газового угля, полученные с объективами иодо-метиленовой иммерсии без кристаллической пластинки (*а*) и с пластинкой $\lambda/4$ (*б*).

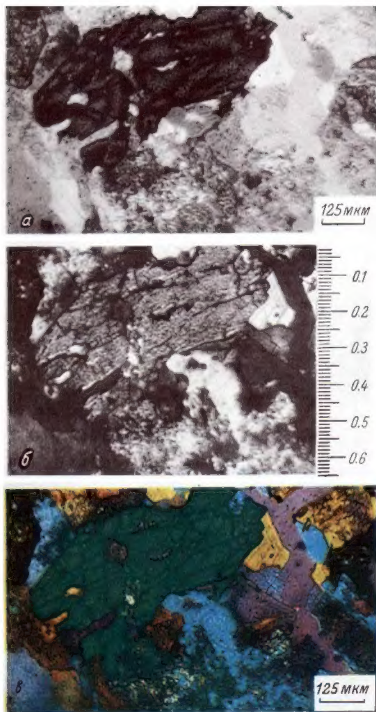


Рис. 164. Микрофотографии гранита (скрещенные поляризаторы, компенсационная пластинка красная первого порядка).

а — на Изопанхроме 18 со светофильтром ЗС10; *б* — то же без светофильтра; *в* — на цветном материале.
(Пояснение к рис. см. также на стр. 152)

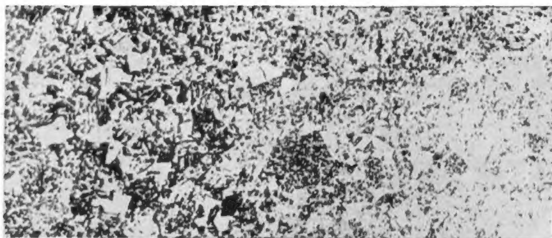


Рис. 166. Микрофотография поверхности заэвтектоидной стали с 1%-м углеродом при градиенте температуры слева направо от 800 до 900° С. Увеличение 200×.

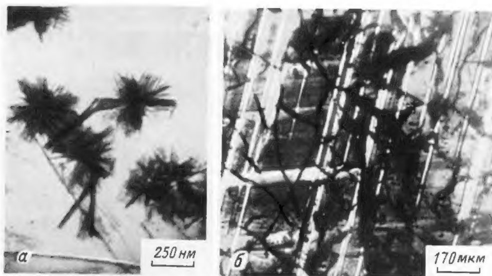


Рис. 167. Микрофотографии, снятые в инфракрасных лучах.
а — бескислородного сульфидно-селенидного стекла; *б* — бурнонита.

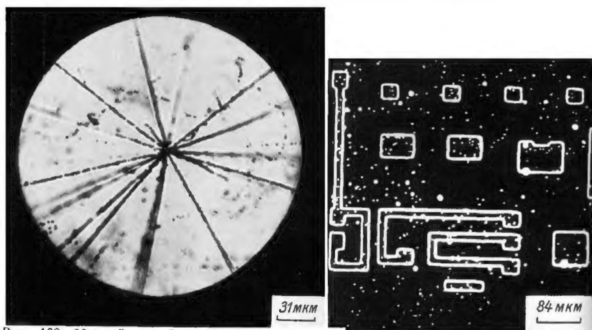


Рис. 168. Микрофотография следов элементарных частиц в толстослойной фотоэмульсии.

Рис. 169. Микрофотография печатной схемы в темном поле.



Рис. 172. Фотография унифицированного функционального узла при $Z=22$ (слева) и $Z=4.5$ (справа).



Рис. 173. Фотография монеты.

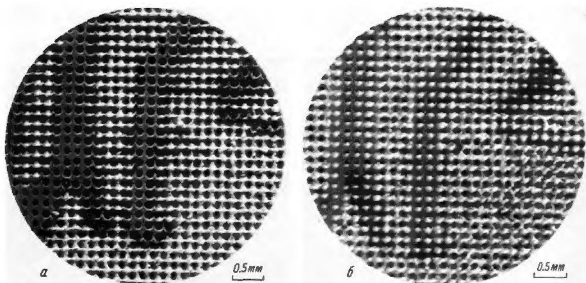


Рис. 174. Фотография клише при скользящем (*а*) и круговом освещении (*б*).

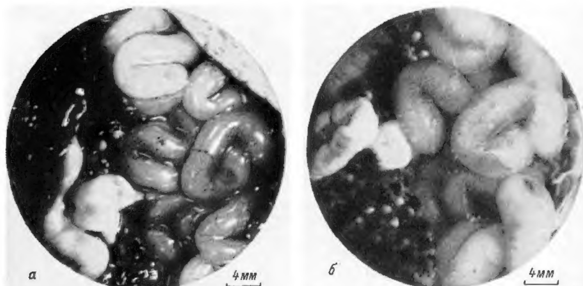


Рис. 175. Фотографии внутренней полости лягушки, находящейся в воздухе (*а*) и в воде (*б*).

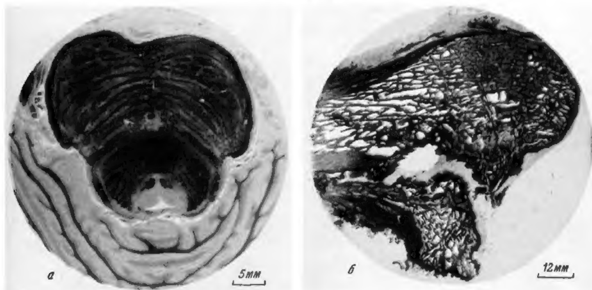


Рис. 176. Фотографии: *а* — среза продолговатого мозга человека в проходящем свете (окраска на миелин); *б* — огнестрельного раневого канала в большой берцовой кости человека.